

Applicazione del saggio di dissoluzione nel controllo della biodisponibilità delle forme farmaceutiche solide orali

1) FABIO CARLI (a), DARIO CERIANI (b), CLAUDIO FRATTINI (c), PAOLO GORLATO (d),
GRAZIA MAFFIONE (a), LUIGI MORO (a), GUIDO NERI (a);

2) ELENA CIRANNI SIGNORETTI

1) A.F.I. - Commissione Biofarmaceutica: (a) Farmitalia Carlo Erba, Milano; (b) Zambon Farmaceutici, Bresso;
(c) Lepetit, Milano; (d) Eurand International, Cinisello Balsamo;

2) Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Chimica del Farmaco, Roma

Il concetto di biodisponibilità di un farmaco non è certo una delle più recenti scoperte in campo biologico, anche se certamente non era presente al tempo in cui farmacista poteva essere sinonimo di alchimista. Tuttavia, l'evoluzione graduale delle scienze farmaceutiche ha permesso di evidenziare che alcuni casi di successo o insuccesso terapeutico erano legati a problemi di biodisponibilità piuttosto che di attività intrinseca del farmaco. La presa di coscienza di questo fenomeno ha portato ad un progressivo interesse di formulatori e clinici attorno ad un problema che non è ancora stato chiarito in tutti i suoi aspetti; esso infatti coinvolge la forma farmaceutica sia nelle sue caratteristiche più propriamente chimico-fisiche sia nel suo destino biologico dal momento dell'immissione nell'organismo alle successive trasformazioni bioindotte. Da ciò risulta chiara l'importanza di una stima della biodisponibilità di un farmaco ottenuta misurando la sua liberazione dalla forma farmaceutica, in condizioni peraltro solo pseudofisiologiche.

Le forme farmaceutiche orali solide, cioè compresse, confetti, capsule, granulati, microcapsule e pellets, vengono normalmente sottoposte a controlli che ne garantiscono la qualità di allestimento: uniformità di peso, uniformità di contenuto della sostanza attiva, tempo di disgregazione e « dissolution rate », ossia la velocità di liberazione della sostanza attiva dalla forma farmaceutica in un determinato tempo *in vitro*, cioè in acqua, in succo gastrico e/o in succo intestinale artificiale.

Le modalità di rilascio di un farmaco dalla forma farmaceutica che lo veicola sono estremamente importanti, dato che differenti formulazioni di uno stesso principio attivo possono dare luogo ad effetti ampiamente differenti *in vivo* qualora una di esse rilasci il farmaco con modalità diverse dall'altra. Le modalità di rilascio determinano infatti il primo step di un farmaco nel suo iter per raggiungere il sito d'azione. Poiché la valutazione di tali modalità utilizzando tecniche di studio *in vivo* è estremamente dispendiosa in termini di costo e tempo, si è reso necessario mettere a punto metodiche *in vitro*, tra cui i tests di dissoluzione, atte a stabilire l'equivalenza tra lotti di una formulazione che si è già dimostrata biodisponibile. Questi tests possono essere utilizzati anche in sede di preformulazione o di formulazione comparando i profili di dissoluzione ot-

tenuti da più formulazioni, allo scopo di selezionare le più biodisponibili.

I tests di dissoluzione sono anche importanti per controllare la stabilità chimico-fisica delle formulazioni: può infatti accadere si verifichi nel tempo un cambiamento del profilo di rilascio senza modificazioni apparenti di titolo. Accanto alla stabilità chimica del farmaco si sta perciò sempre più affermando il concetto di caducità del farmaco, cioè la valutazione degli effetti prodotti sul farmaco dal complesso di interazioni che intervengono all'atto della sua inclusione in un sistema complesso determinato dalla presenza di eccipienti e di stress di varia natura.

Le determinazioni dell'uniformità di peso e contenuto e del tempo di disgregazione sono descritte su quasi tutte le principali farmacopee. Il test di dissoluzione, invece, che sta diventando sempre più importante nei laboratori di ricerca e sviluppo e in quelli di controllo di qualità, è riportato a livello di monografie nelle farmacopee britannica, americana e giapponese [1-3].

La BP 1980 dedica un intero paragrafo a questo tema enunciando i principi adottati nella scelta dei farmaci da sottoporre a test di dissoluzione.

In sintesi sono stati scelti quei farmaci che:

- possono dar luogo a problemi clinici se l'intera dose somministrata non diventa disponibile (n.d.r. a questo proposito è da segnalare l'importanza del criterio adottato che però potrebbe essere generalizzato, infatti un farmaco in quanto tale crea problemi clinici se una volta decisa la somministrazione questo non viene assorbito). Ci si potrebbe forse chiedere se la BP abbia adottato il criterio della suddivisione tra farmaci essenziali e di conforto;

- sono stati scelti inoltre quei farmaci le cui caratteristiche chimico-fisiche (es. bassa solubilità) possono generare problemi di biodisponibilità;

- un'ulteriore classe di farmaci scelta comprende quelli per i quali la legislazione chiede una conferma di bioequivalenza la BP afferma inoltre che « il test indica la porzione di farmaco capace di andare in soluzione sotto condizioni standardizzate entro un ragionevole tempo ».

Intende per « porzione sostanziale » il 70 % e per « tempo ragionevole » i 45 min. Fissa così univocamente

questi limiti e per condizioni standardizzate intende 100 rpm, apparecchiatura con beaker a fondo piatto e rotore a basket. Questo dopo aver premesso che la dissoluzione è un semplice requisito fisico della forma in questione e che non è essenziale ricavarne correlazioni tra i risultati ottenuti ed il comportamento *in vivo* di tali forme farmaceutiche. Indica poi una seconda casistica che afferma essere ristretta a pochi casi particolari e dove si chiede « di più » al test di dissoluzione. Sono i casi in cui il farmaco ha basso indice terapeutico, breve emivita plasmatica, limitato e selettivo assorbimento gastro intestinale, rilascio che non deve essere troppo rapido, azione rapida e specifica di una singola dose.

In questi casi si riserva di chiedere che vengano dimostrate adeguate correlazioni con il comportamento *in vivo* in questione. La BP conclude l'argomento includendo tutte quelle preparazioni che vantano caratteristiche di rilascio prolungato o programmato segnalando però la difficoltà di ottenere validi risultati. Segue l'elenco delle 19 monografie riportate che risultano pertanto molto esigue rispetto all'ampiezza dei criteri indicati [4].

Per contro, la USP XX è molto concisa nell'elencare i principi ispiratori, affermando che: « Il comportamento di una forma orale solida al test di dissoluzione è un utile criterio di controllo delle variabili di formulazione e di processo che possono influenzare la biodisponibilità del o dei principi attivi contenuti » [5].

La correlazione dei dati *vivo-vitro* può non esserci, mentre il dissolution test è comunque un valido aiuto nel controllo delle variabili di fabbricazione.

A questa concisione fa per contro seguito un'ampissima serie di monografie così quantificate:

	Anno	Monografie presenti n.
USP XVIII	1970	6
USP XIX	1975	23
USP XX	1980	58
USP XX (agg.)	1982	255

Questo numero peraltro non è da considerarsi esattivo, in quanto il comitato di revisione esecutivo della USP già dal 1975 affermava che tutte le forme orali devono possedere specifiche monografie di Dissolution test, con eccezione di quei casi ove fosse giudicata inappropriata tale inclusione.

Tale lavoro, afferma la USP, non è stato portato fino in fondo, cioè alla totalità delle monografie, per diversi motivi: limitata capacità di sviluppare tale lavoro, difficoltà connesse a formulazioni complicate, riluttanza alla realizzazione di tale concezione da parte della FDA e dei produttori.

Pur senza contraddire quanto detto, già alla fine del 1980 la commissione della farmacopea responsabile del capitolo « Dissolution » faceva proprie le sollecitazioni provenienti dal Pharmacopoeal Forum relative alle guidelines per i requisiti di dissoluzione.

In tali annotazioni si sollecitava la presa in esame della letteratura esistente, relativa alla biodisponibilità, prodotta anche dai fabbricanti di forme orali solide. Laddove questa fosse esistita si dava mandato alla commissione di verificare la validità dei dati *in vivo* e tenerli in adeguata considerazione nella stesura delle specifiche di dissoluzione relative. Vengono poi indicati degli standard generali, cui dovrebbero sottostare tutte le compresse e capsule, così riassumibili: non meno

del 75 % in non più di 45 min in 900 ml di H₂O con Apparato 1 (basket) a 100 rpm o Apparato 2 (paddle) a 50 rpm. Da una prima analisi dei nuovi prodotti da sottoporre a test di dissoluzione introdotti dal supplemento 3 e Addendum alla USP XX non sembra che questo criterio sia applicato in modo generale, essendo indicate anche altre condizioni operative ed altri limiti.

Esistono quindi due atteggiamenti sostanzialmente diversi:

- la BP che, in base ad alcune considerazioni e criteri chimici, biologici e terapeutici non sempre convincenti, elenca una serie di farmaci e forme farmaceutiche decisamente limitata;

- la USP che non entra a definire tali criteri, ma, affermando la validità del Dissolution test come controllo di formulazione ed *in process*, include di conseguenza tutte le specialità orali solide, adeguandosi negli anni per realizzare tale normativa.

Particolare importanza viene inoltre data, anche dalla commissione di revisione, alla definizione sempre più precisa e dettagliata del test in tutti i suoi parametri sperimentali compresa l'adozione di compresse standard per la taratura del metodo.

Considerando le proposte di introduzione del test di dissoluzione in altre Farmacopee, va segnalato come in Francia il Prof. A. Le Hir [6] nel 1981 abbia proposto di introdurre in farmacopea francese, come pure in quella europea, i tests di dissoluzione uniformandosi a quanto descritto dalla USP XX, utilizzando cioè come apparecchiature il *basket* e il *paddle*. Parallelamente la sezione Laboratori di Controllo e Farmacisti dell'Industria della F.I.P. (Fédération Internationale Pharmaceutique) [7] suggerisce di elaborare delle monografie per i tests di dissoluzione da sottoporre alla Commissione per la Farmacopea Europea. Non si ha quindi una univoca indicazione o standardizzazione nell'esecuzione del test né una esatta individuazione di un apparato di misura universale valido. La vastità delle caratteristiche delle forme farmaceutiche da sottoporre al test non permette infatti di individuare in nessuno degli apparecchi usati in questo campo un esatto riscontro alle richieste dello sperimentatore esattamente dimensionate di volta in volta in funzione delle specifiche del prodotto da analizzare. Infatti, il gran numero di apparecchi disponibili per l'effettuazione del test risponde non tanto a criteri commerciali, in quanto ben pochi tra essi hanno una diffusione tale da giustificarli, bensì trova spiegazione nel tentativo di ovviare a inconvenienti, più o meno diffusamente segnalati, incontrati nell'effettuazione del test con i più comuni apparecchi. Nel tentativo di effettuare una trattazione sistematica della materia, si è tentato di raggruppare gli apparecchi in base ad alcune caratteristiche che soddisfano vari livelli di prestazione insiti nella dinamica stessa del test [8-10].

Elementi di differenziazione tra le varie apparecchiature sono stati riscontrati in relazione a:

- geometria della camera di dissoluzione
- sistema di agitazione
 - esterno
 - interno
- posizionamento del campione

- volume della camera di dissoluzione —
 - fisso
 - variabile
- dispositivo di filtrazione —
 - assente
 - presente
- sistema di prelevamento —
 - manuale
 - automatico —
 - discontinuo
 - continuo

Non essendo possibile, a causa della loro enorme diffusione e del continuo aggiornamento cui sono sottoposti, effettuare una panoramica completa degli apparecchi allestiti per l'effettuazione dei test di dissoluzione la nostra attenzione si è forzosamente soffermata su quelli ufficialmente raccomandati o maggiormente usati:

- USP XX Apparatus: type I e II,
- BP Dissolution Apparatus,
- Rotating flask dissolution apparatus,
- Continuous flow rotating basket dissolution apparatus,
- Rotating filter stationary basket method,
- Sartorius dissolution simulator,
- Magnetic basket dissolution apparatus,
- Peristaltic apparatus,
- Column methods.

Procedendo ad una veloce carrellata di questi apparecchi un posto preminente, per la diffusione di cui gode, spetta senza dubbio all'*USP apparatus I* [1] che è costituito essenzialmente da:

- recipiente cilindrico con fondo sferico con capacità di 1000 ml dotato di coperchio;
- cestello cilindrico costituito da rete ondulata da 40 mesh;
- motore a velocità variabile.

Per unanime definizione, esso non consente una buona omogeneità del mezzo di dissoluzione a bassa velocità di agitazione e la riproducibilità dei risultati, come per la maggior parte degli altri apparecchi, non è sempre soddisfacente.

USP XX Dissolution test: Apparatus 2.

Simile al precedente presenta un agitatore a pala (paddle) di teflon in sostituzione del cestello come dispositivo di agitazione. È stato segnalato qualche problema relativo al posizionamento del campione (flottazione). Gli sono peraltro riconosciute buona omogeneità del mezzo di dissoluzione e migliore riproducibilità dei risultati.

USP XX Dissolution test: Apparatus 3.

Nell'esecuzione del test, in questo caso, si usa l'apparato utilizzato per la disaggregazione delle compresse sostituendo la rete da 10 mesh con una da 40 mesh, che viene aggiunta anche all'estremità superiore del cestello in modo da impedire la flottazione delle compresse o capsule provocata dalla mancanza dei dischi normalmente usati per determinare il tempo di disagre-

gazione. Questo apparecchio, apparso sulla USP XX nel 1980, non è più riportato nell'ultimo aggiornamento (1982).

BP Dissolution test apparatus [2].

È costituito da:

- beacker a fondo piatto di forma cilindrica con capacità di 1000 ml;
- motore a velocità variabile: $25/150 \text{ rpm} \pm 5\%$;
- basket cilindrico di acciaio inox costituito da maglie ondulate con un'apertura di $425 \mu\text{m}$;
- dispositivo atto al prelievo di campioni in un punto medio rispetto allo spazio del cestello alla parete.

Sono segnalati anche per questo apparecchio problemi di omogeneità del fluido di dissoluzione, nonché il possibile intasamento delle maglie del cestello.

Accanto ai metodi ufficializzati, di più o meno semplice derivazione dal prototipo di Levy, sono stati sviluppati altri apparecchi rispondenti a specifiche richieste dallo sperimentatore. Una modificazione evidente della camera di dissoluzione e del sistema di agitazione è stata introdotta da Gibaldi e Winteraub nel *Rotating flask dissolution apparatus* [11] costituito da un pallone sferico di vetro sospeso in un bagno termostatico attraverso 2 sostegni in vetro fusi ad esso in modo da formare l'asse rotazionale della sfera. Il dispositivo di agitazione non prevede variazioni di velocità.

Il *Continuous-Flow dissolution apparatus - Rotating Basket* [12] costituisce uno sviluppo di questo concetto. L'apparecchio è basato sul metodo del cestello introdotto da Pernarowski [13]: in esso, però, il fluido di dissoluzione viene riciclato da una pompa a una velocità maggiore di 70 ml/min.

Rotating filter - Stationary basket method [14].

Le caratteristiche essenziali di questo apparecchio sono:

- il cestello stazionario contenente il campione;
- un apparecchio di filtrazione ruotante che provvede anche all'agitazione del fluido;
- la possibilità di operare con diversi volumi di fluido di dissoluzione. Questo apparecchio è stato applicato sia nella fase di preformulazione, sia nello sviluppo di formulazioni, sia in fase di controllo di qualità.

Il prelievo attraverso un dispositivo di filtrazione permette l'uso di questo apparecchio anche nella determinazione della velocità di dissoluzione di farmaci in bulk. È però un apparecchio relativamente complesso e quindi di difficile assemblaggio.

Sartorius dissolution simulator [15-16].

L'apparecchio rivendica una buona simulazione delle condizioni fisiologiche in cui avviene il fenomeno della dissoluzione grazie a un particolare design e alla possibilità di riprodurre le sollecitazioni cui il farmaco è sottoposto *in vivo* dai movimenti peristaltici del tratto gastroenterico. L'apparecchio è completamente automatizzato anche per quanto riguarda il prelievo, la filtrazione e la raccolta del campione. Vi è pertanto una buona riduzione dell'errore casuale a tutto vantaggio della riproducibilità dei risultati.

Magnetic basket dissolution apparatus [17].

Questa apparecchiatura nasce come modificazione del metodo di Levy: permette un esatto posizionamento delle forme farmaceutiche da analizzare, sia compresse che capsule, in modo da assicurare la riproducibilità del sistema ed eliminare le capsule flottanti. Infatti, il cestello viene fissato ad un magnete che sottoposto a campo magnetico si orienta in modo definitivo e riproducibile di volta in volta.

Peristaltic Apparatus di Simmons [18].

Questo apparecchio nasce dall'osservazione della fondamentale importanza dei moti peristaltici generati e trasmessi dalla muscolatura gastroenterica: sono infatti essi i responsabili delle caratteristiche idrodinamiche che si verificano durante la dissoluzione dei farmaci nell'organismo. Sulla base di tali acquisizioni e allo scopo di riprodurre le condizioni fisiologiche in questo apparecchio si utilizza un flusso di liquido generato da una pompa peristaltica a velocità costante: la turbolenza nella camera di dissoluzione produce dei moti randomizzati della forma farmaceutica e fornisce l'agitazione necessaria alla dissoluzione. L'apparecchio è semplice ed applicabile a compresse e capsule.

Column Method [19].

L'osservazione che le migliori correlazioni *vivo-vitro* vengono ottenute nei casi di flusso laminare è all'origine dello sviluppo dei metodi a colonna. L'apparato è costituito dai seguenti componenti:

- serbatoio di fluido,
- pompa peristaltica,
- scambiatore di calore,
- colonna,
- supporto per compressa,
- sistema di filtrazione.

Tra questi metodi segnaliamo quello proposto da Marshall: con questo apparecchio si ottiene che la forma farmaceutica venga sospesa in un flusso turbolento mentre all'estremità superiore del tubo separatore si verificano condizioni di flusso laminare. Anche Langenbucher [19] suggerisce questo metodo per la semplicità e la riproducibilità. Altri autori [20-22] consigliano l'utilizzo di questo apparecchio nella valutazione della velocità di dissoluzione intrinseca di un farmaco o di una matrice non disgregabile del farmaco in ragione del flusso idrodinamico controllato, mentre sarebbe meno affidabile per valutare la velocità di dissoluzione del farmaco da capsule o compresse disintegrabili a causa di possibili intasamenti del filtro.

Analoga attenzione, oltre che alle apparecchiature, è stata dedicata all'analisi dei requisiti e delle modalità di svolgimento del test. Generalmente, ogni gruppo di studio che ha affrontato il problema, propone di ufficializzare la propria esperienza dettando delle « guidelines » relative a tali requisiti a tali modalità. Le indicazioni che seguono hanno quindi carattere generale e non necessariamente concordano con quanto proposto dai vari gruppi. Pertanto ogni singola applicazione richiederà ulteriori specificazioni.

Elenchiamo brevemente le principali indicazioni contenute nelle già citate « guidelines » [7]:

- le condizioni di analisi dovrebbero garantire riproducibilità e accuratezza di risultati in laboratori diversi, aventi una normale dotazione analitica;

- la temperatura ed il volume del solvente dovrebbero essere standardizzati e, quando fissati, devono restare costanti durante lo svolgimento del test: la velocità di agitazione del mezzo di dissoluzione dovrebbe poter essere variata, mantenendosi però relativamente mite, evitando turbolenze e vibrazioni di qualsiasi genere;

- il mezzo di dissoluzione dovrebbe essere il più semplice possibile garantendo pertanto una buona riproducibilità: dovrebbe essere essenzialmente un sistema acquoso e in quantità tale da soddisfare sempre le *sink conditions*;

- poiché molti farmaci hanno una solubilità pH-dipendente, forza ionica e pH del mezzo di dissoluzione dovrebbero essere costantemente controllati; sono quindi da preferirsi le soluzioni tamponate rispetto l'acqua, citata per altro in diverse monografie;

- i valori di pH entro cui operare dovrebbero rientrare in un intervallo significativamente fisiologico e, prima di effettuare tale scelta dovrebbe essere preso in considerazione il profilo di solubilità del farmaco in funzione dei valori di pH stessi.

Questa considerazione riveste particolare importanza per le forme farmaceutiche a rilascio controllato, poiché, in relazione ai tempi di permanenza nel tratto gastro-intestinale, le variazioni di pH entro questo intervallo assumono un maggior significato di adeguamento del *vitro al vivo*.

- particolare attenzione dovrà essere usata per l'impiego di agenti tensioattivi, che potrebbero alterare le caratteristiche di dissoluzione del farmaco;

- sviluppo di bollicine gassose durante il riscaldamento del liquido di dissoluzione possono alterare il profilo di rilascio: è pertanto preferibile effettuare una accurata deaerazione;

- la geometria delle apparecchiature dovrà essere la più semplice possibile e di dimensioni tali da permettere il mantenimento delle *sink conditions*;

- il recipiente di dissoluzione dovrà essere trasparente e tutte le parti a contatto con il mezzo di dissoluzione dovranno essere chimicamente e fisicamente inerti. I recipienti dovranno garantire sempre dimensioni esatte ed il vetro è sicuramente il più adatto;

- l'apparato deve permettere un'adeguata introduzione del campione nel mezzo di dissoluzione dove deve rimanere immerso durante il test;

- il campione non deve subire stress meccanici mantenendo cioè il proprio microintorno, garantendo contemporaneamente una sufficiente agitazione del solvente;

- per quanto riguarda la campionatura che dovrà essere comunque rappresentativa, nei metodi a flusso continuo essa non presenta particolari problemi; nel caso di utilizzo di metodi ad agitazione meccanica, invece, dovrà essere effettuata ad intervalli di tempo stabiliti, assumendo una perfetta omogeneità del mezzo di dissoluzione. Le aliquote prelevate dovranno essere integrate costantemente;

- il metodo di analisi per i test di dissoluzione non dovrà essere necessariamente specifico per il principio attivo, se la stabilità e la purezza del farmaco verranno determinate separatamente;

- l'apparecchiatura dovrebbe essere utilizzabile per la valutazione della maggior parte di forme farmaceutiche solide senza rendere necessarie modificazioni di rilievo degli elementi costitutivi.

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti dai test di dissoluzione *in vitro* delle varie forme farmaceutiche, né l'USP XX né la BP 1980 danno un'indicazione univoca di un parametro che esprima significativamente l'andamento del processo. Infatti, i due testi prescrivono soltanto la percentuale di principio attivo che deve essere disciolto ad un tempo prestabilito. La scarsa capacità discriminante di tale parametro [7] nella interpretazione del fenomeno di dissoluzione appare evidente: formulazioni con profili di dissoluzione sostanzialmente diversi possono apparire equivalenti secondo questo tipo di interpretazione. È possibile ottenere una stima migliore del profilo di dissoluzione estrapolando i tempi necessari a raggiungere due diverse percentuali di principio attivo disciolto. Affrontando di conseguenza questa vasta problematica, sono stati fatti vari tentativi di monitorare la dinamica del processo. Una delle proposte più originali è il metodo della « Dissolution efficiency » di Khan [23]. Secondo questa metodica, il processo è valutato attraverso il rapporto tra l'area sottesa alla curva di dissoluzione e quella ottenuta considerando un rilascio istantaneo del 100 % del farmaco. I limiti di tale approccio consistono nell'arbitrarietà della scelta del tempo considerato e nella misconoscenza della peculiarità della forma della curva stessa [24]. Un diverso approccio per valutare il processo di dissoluzione è indagarne la cinetica, utilizzando un modello matematico che correli i dati sperimentali ottenuti cioè la percentuale di principio attivo disciolto e il relativo tempo.

Noyes e Whitney proponevano già nel 1897 [25] l'equazione:

$$\frac{dW}{dt} = K S C_s$$

dove: $\frac{dW}{dt}$ = velocità di dissoluzione;

S = area superficiale esposta al fluido di dissoluzione;

C_s = concentrazione di saturazione del farmaco considerato;

K = costante di velocità.

Questa legge è però valida solo se il processo avviene per diffusione controllata e in condizioni sink [26].

Molto spesso queste condizioni sono difficilmente rispettabili sperimentalmente poiché la concentrazione del principio attivo è tale da non permettere il mantenimento di condizioni sink e la superficie disponibile alla dissoluzione non è costante. Ciò determina profili di dissoluzione da cui non è più possibile calcolare una costante di velocità di ordine zero come proposto da Noyes e Whitney. Gibaldi e Feldman [27] hanno pro-

posto di utilizzare equazioni cinetiche di 1° ordine per linearizzare le curve di dissoluzione di farmaci in forme farmaceutiche solide:

$$\log (\% \text{ non disciolto}) = \log (C_s S) - \frac{K}{2.303} \cdot t$$

Anche questo metodo non è comunque in grado di tener conto della variazione della superficie disponibile alla dissoluzione che si verifica nel caso di compresse, dove la superficie esposta aumenta esponenzialmente durante il processo [28].

Hixon e Crowell [29] hanno dimostrato che in questi casi l'area superficiale esposta può essere correlata alla quantità del principio attivo non disciolto utilizzando fattori di forma e volume. L'applicazione di tali equazioni è comunque un artefatto perché non considera che la cessione del farmaco non avviene solo da particelle finemente disperse ma inizia già al primo contatto tra la compressa intatta e il fluido di dissoluzione e procede poi da granuli grossolani [30].

Considerando la molteplicità dei fattori che intervengono nel processo di dissoluzione, Wagner [30] propone di utilizzare delle funzioni di distribuzione normale per correlare i dati sperimentali. Questo metodo è applicabile quando la frazione percentuale di superficie esposta varia con una funzione di frequenza normale rispetto al logaritmo del tempo.

Plottando i dati della percentuale disciolta di farmaco contro il logaritmo del tempo su un'opportuna scala probabilistica, il coefficiente angolare della retta così ottenuta può essere considerato una buona stima del processo. Se, d'altro canto, non si verifica una funzione di frequenza normale della superficie esposta, Langenbucher [31] propone di utilizzare la funzione di Weibull [32]:

$$y = 1 - \exp -(t - t_d)^{b/a}$$

dove:

b = fattore di forma;

a = fattore;

t_d = parametro di « location ».

Questa equazione, linearizzata e trasformata, permette di ricavare i parametri della retta (b = slope; $-\log a$ = intercetta) da cui è possibile risalire al termine t_d . Quest'ultimo è una stima del processo di dissoluzione più rigorosa del $t_{50\%}$.

In alternativa alle proposte che tendono a considerare la variazione di area superficiale che ha luogo durante il processo di dissoluzione, Kitazawa, partendo dal presupposto che l'area superficiale di principio attivo disponibile per la dissoluzione possa essere considerata costante [33], ha sviluppato la seguente teoria: sostituendo al valore della C_s dell'equazione di Noyes-Whitney [25] il valore C_∞ (ovvero la concentrazione del principio attivo al termine della dissoluzione), si riesce a correlare con una equazione semilogaritmica il rapporto tra la quantità di principio attivo presente dopo la completa dissoluzione e la quantità di principio attivo non disciolto al tempo considerato [34].

$$\ln \frac{W_\infty}{W_\infty - W_t} = K' \cdot t$$

dove:

W = quantità del principio attivo a dissoluzione terminata;

$C_{\infty} - C_t$ = quantità di principio attivo ancora indissolta al tempo considerato.

In un lavoro in cui venivano comparate le soluzioni proposte da Gibaldi e Feldman, Wagner, Langenbucher, Khan e Kitazawa, Goldsmith [24] ha concluso che non esiste alcun vantaggio nell'esprimere i dati di dissoluzione secondo modelli matematici ma è opportuno considerare il profilo di dissoluzione riferendosi ai tempi in cui più frazioni percentuali di principio attivo sono disciolte (es.: $t_{20\%}$ — $t_{50\%}$ — $t_{63,2\%}$ — $t_{80\%}$ — $t_{90\%}$). Sulla base delle esperienze di Goldsmith e delle indicazioni tratte da quanto descritto in letteratura nessun approccio matematico sembra poter fornire indicazioni maggiori per una migliore discriminazione delle caratteristiche di dissoluzione di diverse formulazioni farmaceutiche.

Appunto per questo, la semplice utilizzazione delle percentuali di principio attivo disciolto in funzione del tempo può comunque essere considerata una utile base per descrivere il processo di dissoluzione e valutare il differente comportamento di diverse formulazioni.

In fase di ricerca (preformulazione) ove occorre avere parametri utili al tentativo di una correlazione *vitro-vivo* l'applicazione dei modelli matematici può essere comunque utile. D'altra parte ecco che nasce l'esperienza di scegliere uno o più parametri della cinetica di assorbimento *in vivo* del farmaco e delle sue forme farmaceutiche che possono correlare con i parametri derivati dai suddetti modelli. Per quanto riguarda questi ultimi, tre sono i parametri *in vivo* che più sono stati considerati come indicatori di una buona performance della forma farmaceutica:

a) il t_{max} , cioè il tempo a cui si ha la massima concentrazione plasmatica del farmaco in esame [35, 36];

b) la C_{max} , cioè la concentrazione plasmatica massima del principio attivo [36-38];

c) l'AUC (*area under the curve*), cioè l'area sottesa alla curva della concentrazione plasmatica in funzione del tempo [35, 36, 38].

Molto diffuso è anche l'impiego, come parametro *in vivo* della concentrazione plasmatica riscontrata ad un tempo prefissato, concentrazione che non è necessariamente quella massima: si veda ad esempio, il lavoro di Simmons [39], in cui vengono impiegate per le correlazioni *vitro-vivo* le concentrazioni plasmatiche rispettivamente a 30 e 60 min, o il lavoro di Pasich [40] o di Raptis [36], in cui i livelli plasmatici considerati sono quelli ad 1 e 2 ore.

Oltre ai livelli ematici, però, molto spesso anche le concentrazioni di farmaco escreto nelle urine vengono impiegate per stabilire una correlazione con i test *in vitro* [41]. In questo caso, solitamente si impiegano i valori di percentuale di farmaco escreto fino ad un certo tempo prefissato [42], oppure la quantità totale di farmaco recuperata nelle urine [43, 44].

Infine, ricordiamo alcuni casi particolari di parametri *in vivo*: il tempo necessario alla comparsa di

una prima concentrazione plasmatica rilevabile del farmaco [45] o il logaritmo dell'area sottesa alla curva livelli plasmatici-tempo [46].

Per quanto riguarda i test *in vitro*, il parametro più impiegato per tentare delle correlazioni con il *vivo* è la percentuale disciolta ad un tempo prefissato, ma è la scelta di tale tempo che varia da autore ad autore. Simmons, ad esempio, ha impiegato le concentrazioni disciolte ai 10 e 20 minuti [39]; Jones quella ad 1 ora [43]; Kent quella a 22 minuti [35]; Raptis ancora quella 20 min [36]; le concentrazioni trovate dopo 1,5, 2 e 2,5 ore di dissoluzione [40]; Meyer quella relativa a 90 min [42].

Un altro parametro *in vitro* molto usato è il tempo a cui si ha la dissoluzione di una percentuale di principio attivo prefissata. Anche in questo caso la scelta di tale valore di percentuale risulta arbitraria e diversa da autore ad autore: ad esempio, Simmons ha impiegato il 60%, cioè il tempo a cui si ha la dissoluzione del 60% del farmaco [47], mentre Raptis [36] ha usato il 50%, come pure Watori [48].

Diversi autori hanno impiegato il 63,2% come il t_d (variabile di dissoluzione), in quanto tale valore è ricavabile dall'equazione di Weibull, usata da alcuni ricercatori per la linearizzazione delle curve di dissoluzione. Sempre a partire dai dati di percentuale di farmaco disciolto in funzione del tempo, altri parametri che sono stati presi in considerazione per le correlazioni *vitro-vivo* sono la pendenza di tali curve ad un tempo prefissato o la pendenza massima [36]. Ricordiamo infine che in taluni casi sono stati usati i logaritmi di alcuni dei parametri *in vitro* sopra ricordati: Wagner [45] ha impiegato il logaritmo del tempo a cui si ha il 50% o l'85% di dissoluzione; Nimmerfall [46] il logaritmo del t_d , cioè del tempo a cui si ha la dissoluzione del 63,2%, ricavato dall'equazione di Weibull.

Per quanto riguarda il tipo di apparecchiatura impiegato per i test *in vitro*, sulla base dei quali si è cercato di stabilire una correlazione *vitro-vivo*, anche in questo caso ci si trova di fronte ad un numero notevole di scelte diverse fatte da diversi ricercatori.

L'apparato USP «rotating basket» è stato impiegato da Wagner [45], Ridolfo [50], Leonard [38], Meyer [42]. L'apparato USP «paddle method» da Kent [35] e da Wolkling [51]. Tra gli altri apparecchi previsti da farmacopee ufficiali, ricordiamo l'apparecchio BP, impiegato da Rubinstein [44].

Naturalmente in molti casi sono stati usati apparecchi non di farmacopea, e tra questi ricordiamo solo l'apparecchio Sartorius [43], e quello di Simmons, basato sulla peristalsi [39-47].

Da quanto detto sopra, risulta evidente che non esiste un approccio prevalente per il tentativo di una correlazione *vitro-vivo*. Ciò dipende essenzialmente dal fatto che, sia per quanto riguarda le tematiche di controllo sia per le elaborazioni matematiche dei dati di dissoluzione, non si è evidenziata una linea di lavoro con risultati nettamente superiore alle altre. Ciò potrebbe suggerire che la scelta sia dell'apparecchiatura che dell'approccio matematico possa essere fatta essenzialmente sulla base di considerazioni tecnico-pratiche, di riproducibilità, di semplicità, ecc.

A conclusione di questo lavoro, anche il nostro gruppo di studio avanza una proposta di ufficializzazione del test di dissoluzione, tenendo presenti quali

ne siano i campi di applicazione e le rispettive esigenze:

– in sede di ricerca o preformulazione si richiede la massima disponibilità e flessibilità nella selezione dell'apparecchiatura da utilizzare, del metodo da applicare e dei parametri da impiegare nella ricerca delle eventuali correlazioni *vivo-vitro*;

– in sede di applicazione, come controllo di qualità, sarà compito degli organismi preposti di stabilire i casi di applicazione e le relative specifiche.

Tali normative dovranno essere il più possibile semplici e riproducibili, prevedere l'impiego di una unica apparecchiatura di semplice assemblaggio e di accettabilità riconosciuta sul piano internazionale.

BIBLIOGRAFIA

1. U.S. Pharmacopoeia, XX Ed. 1980, p. 959.
2. British Pharmacopoeia. 1980. 2, Appendix XII B, A: 113-115, 728.
3. The Pharmacopoeia of Japan, X Ed. 1981, pp. 729-733.
4. British Pharmacopoeia. 1980. 1: XVIII-XIX.
5. U.S. Pharmacopoeia, XX Ed. 1980. XXXIX.
6. LE HIR, A. 1981. Vers l'officialization de l'essai de dissolution. *Sci. Techn. Pharm.* 10: 19-31.
7. F.I.P. Guidelines for dissolution testing of solid oral products. 1981. *Drugs in Ger.* 24: 90-105.
8. SWARBRICK, J. 1970. In: *Current concepts in the pharmaceutical sciences: biopharmaceutics*. Swarbrick (Ed.). Lea and Febiger, Philadelphia, p. 276.
9. HERSEY, J. A. 1969. Method available for the determination of in vitro dissolution rate, based on a paper given at the British Pharmaceutical Conference, Birmingham, 1968. *Manufact. Chem. Aerosol News*. 40: 32-35.
10. STRICKER, H. 1976. In vitro studies on the dissolution and absorption behaviour of orally administered drugs and the connection to their bioavailability. In: *The quality control of medicines*. Deasy & Timoney (Ed.). Elsevier, Amsterdam. Chap. 16.
11. GIBALDI, M. & WEINTRAUB, H. 1970. Quantitative correlation of absorption and in vitro dissolution kinetics of aspirin from several dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 59: 725-726.
12. PERNAROWSKI, M. 1974. In: *Dissolution Technology*. L. Leeson & J. T. Carstensen (Ed.). Industrial Pharmaceutical Technology Section, Academy of Pharmaceutical Sciences. Washington, D.C., p. 58.
13. PERNAROWSKI, M., WOO, W. & SEARL, R. O. 1968. Continuous flow of the dissolution characteristics of tablets and capsules. *J. Pharm. Sci.* 57: 1419-1421.
14. ASHOK SHAH, C., PEOT, C. B. & OCHS, J. F. 1973. Design and evaluation of a rotating filter-stationary basket in vitro dissolution test apparatus I: Fixed fluid volume system. *J. Pharm. Sci.* 62: 671-677.
15. STRICKER, H. 1971. *Drugs made in Ger.* 14: 93.
16. STRICKER, H. 1973. *Drugs made in Ger.* 14: 80.
17. SHEPHERD, R. E., PRICE, J. C. & LUZZI, L. A. 1972. Dissolution profiles for capsules and tablets using a magnetic basket dissolution apparatus. *J. Pharm. Sci.* 61: 1152-1156.
18. SIMMONS, D. L., LEGORE, A. A., PICOTTE, P., LEE, K. S. & JOSHI, N. N. 1975. A dissolution rate apparatus for the prediction of initial drug absorption patterns in beagles: tolbutamide tablets. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 3: 39-49.
19. LANGENBUCHER, F. 1969. In vitro assessment of dissolution kinetics; description and evaluation of a column-type method. *J. Pharm. Sci.* 58: 1265-1272.
20. MARSHALL, K. & BROOK, D. B. 1969. A simplified dissolution rate apparatus. *J. Pharm. Pharmacol.* 21: 790-792.
21. FEE, J. V., GRANT, D. J. W. & NEWTON, J. M. 1973. The effect of solvent flow on the dissolution rate of a non-disintegrating solid. *J. Pharm. Pharmacol.* 25: 148-149.
22. TINGSTAD, J. E. & RIEGELMAN, S. 1970. Dissolution rate studies I: design and evaluation of a continuous flow apparatus. *J. Pharm. Sci.* 59: 692-696.
23. KHAN, K. A. 1975. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* 27: 48-49.
24. GOLDSMITH, J. A., RANDALL, N. & ROSS, S. D. 1978. On methods of expressing dissolution rate data. *J. Pharm. Pharmacol.* 30: 347-349.
25. NOYES, A. A. & WHITNEY, W. R. 1897. *J. Am. Chem. Soc.* 19: 930.
26. LEESON, L. J. & CARSTENSEN, J. T. 1974. *Dissolution technology*. The industrial pharmacy technology section of the Academy of Pharmaceutical Science. Chapt. 1, pp. 1-28.
27. GIBALDI, M. & FELDMAN, S. 1967. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. *J. Pharm. Sci.* 56: 1238-1242.
28. WAGNER, J. G. 1971. *Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics*. Drug Intell. Publ., pp. 110-114.

29. HINON, H. & CROWELL, J. 1931. *Ind. Eng. Chem.* **23**: 923.
30. WAGNER, J. G. 1969. Interpretation of Percent Dissolved-Time Plots Derived from *In vitro* testing of Conventional Tablets and Capsules. *J. Pharm. Sci.* **58**: 1253-1257.
31. LANGENBUCHER, F. 1972. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *J. Pharm. Pharmacol.* **24**: 979-981.
32. WEIBULL, W. 1951. *J. Appl. Mechanics.* **18**: 293.
33. SHIKIFUMI KITAZAWA, IKUO JOHNO, YOKO ITO, SHIGEO TERAMURA & JUTARO OKADA. 1975. Effects of hardness on the disintegration time and the dissolution rate of uncoated caffeine tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* **27**: 765-770.
34. SHIKIFUMI KITAZAWA, IKUO JOHNO, TOKUZO MINOUCHI & JUTARO OKADA. 1977. Interpretation of dissolution rate data from *in vitro* testing of compressed tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* **29**: 453-459.
35. KENT, J. S., MROSZAK, E. J., ROE, R. L. & RUNKEL, R. 1981. Bioavailability and *in vitro* dissolution of tiopinac from solution and capsule formulations. *Int. J. Pharmac.* **7**: 245-260.
36. RAPTIS, G., WENDT, H., MEISTER, R. & FUCHS, P. 1978. *In vitro* and *in vivo* availability of spironolactone from various oral preparations. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **4**: 389-411.
37. CHAKRABORTI, S., MOERMON, E. & BELPAIRE, F. 1979. Bioavailability of Phenytoin in Dogs: Effects of Crystal form and particle size. *Pharmazie*. **34**: 242-243.
38. LEONARD, G. S., TOVEY, G. D. & LEE, R. M. 1979. The pharmaceutical development and bioavailability of cimetidine capsule and tablet formulations. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **5**: 217-226.
39. SIMMONS, D. L., LEGORE, A. A. & PICOTTE, P. 1980. Peristaltic dissolution apparatus: prediction of relative *in vivo* performance of prednisone tablets in humans. *J. Pharm. Sci.* **69**: 220-222.
40. PASICH, J., GOLOCH, B. & KUSTRA, K. 1979. Dynamik der Arzneimittelabgabe aus Suppositorien. *Pharmazie*. **34**: 413-414.
41. TIDD, M. J., COLLINS, W. T. & CHAMBERLAIN, J. 1976. A comparison of dissolution and bioavailability characteristics of three spironolactone tablet formulations, including preliminary data on two spironolactone metabolites. *J. Int. Med. Res.* **4**: 86-95.
42. MEYER, M. C., SIIWKA, G. W., DANN, R. E. & WHYATT, P. L. 1974. Bioavailability of 14 nitrofurantoin products. *J. Pharm. Sci.* **63**: 1693-1698.
43. JONES, H. & BYE, A. 1979. Correlation of bioavailability in man with simulated absorption data for three doxantrazole preparations. *J. Pharm. Pharmacol.* **31**: 730-733.
44. RUBINSTEIN, M. & RUGHANI, J. 1978. The effect of four tablet binders on the bioavailability of fusemide from 40 mg tablets. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **4**: 541-553.
45. WAGNER, J. G. & COLL. 1979. *J. Pharmak. Biopharm.* **7**: 147-158.
46. NIMMERFALL, F. & ROSENTHALER, J. 1980. *J. Pharm. Sci.* **69**: 605-607.
47. SIMMONS, D. L. & COLL. 1977. *Can. J. Pharm. Sci.* **12**: 85-87.
48. WATARI, N. & COLL. 1980. *Chem. Pharm. Bull.* **28**: 2221-2225.
49. LANGENBUCHER, F. & MOLLER, H. 1982. Mathematical techniques for correlating *in vitro* release with *in vivo* response functions. In: *Atti del 42° Congresso Internazionale della FIP*. Copenhagen.
50. RIDOLFO, A. S., THOMPSON, L., BECHTOL, L. D. & CARMICHAEL, R. H. 1979. Benoxaprefen, a new anti-inflammatory agent: particle-size effect on dissolution rate and oral absorption in humans. *J. Pharm. Sci.* **68**: 850-852.
51. WOLKLING, W. D., NAYAK, R. K., PLOSTNIEKS, J. & CRESSMAN, W. A. 1979. A partially organic dissolution medium for griseofulvin dosage forms. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **5**: 17-27.

Studi di farmacocinetica con preparazioni «ritardo»

GIOVANNI ZANOLO

Istituto di Ricerche Biomediche « Antoine Marxer » RBM S.p.A., Ivrea

INTRODUZIONE.

L'enorme sviluppo delle nuove formulazioni galeniche che vanno sotto il nome di *Drug Delivery Systems*, è in parte dovuto alla crescente difficoltà che l'industria farmaceutica a livello mondiale incontra nell'introdurre sul mercato molecole originali.

Da qui la tendenza a rivolgersi verso molecole note già introdotte sul mercato la cui efficacia terapeutica non è completamente espressa dall'incorporamento in formulazioni galeniche convenzionali, caratterizzate cioè da una rapida cessione del principio attivo [1].

D'altra parte alcuni autori, in particolare Urquhart [2, 3], cercano da qualche tempo di legittimare da un punto di vista scientifico la validità di questo tipo di operazioni. Secondo questo autore esiste una differenza concettuale tra forme convenzionali e nuove formulazioni nel senso che le prime sono caratterizzate esclusivamente dalla quantità di principio attivo in esse contenuto mentre le seconde sono essenzialmente specificate dal parametro velocità di rilascio. Questo passaggio da un concetto statico di dosaggio (basato cioè sulla quantità) ad uno dinamico (fondato cioè sulla velocità di rilascio) dovrebbe portare a decisivi miglioramenti nell'ottimizzazione dell'azione terapeutica di molti farmaci.

Partendo da questo tipo di considerazioni, in questi ultimi anni sono state studiate, soprattutto dal gruppo

californiano dell'« Alza », soluzioni tecnologiche nuove allo scopo di ottenere dei cosiddetti *systems* terapeutici caratterizzati da velocità di rilascio dei principi attivi perfettamente specificate [4-6]. Nella Tab. 1, sono riportati alcuni esempi di questi *systems*. Occorre tuttavia sottolineare come queste nuove tecnologie rappresentino soluzioni ancora di « frontiera » essendo attualmente la quasi totalità del mercato dei *Drug Delivery Systems* rappresentata dalle forme orali ad azione ritardata. Una review esauriente su queste formulazioni farmaceutiche è stata recentemente pubblicata sulla rivista « Farmaci » [7].

Di particolare importanza in questo campo sono le tecnologie di microincapsulazione efficaci per periodi di 8-12 ore. È chiaro che per la ricerca e lo sviluppo di queste formulazioni diventa indispensabile la conoscenza delle correlazioni tra i test di rilascio *in vitro* ed i parametri cinetici ottenuti *in vivo* utilizzando l'animale da esperimento o l'uomo.

PARTE SPERIMENTALE.

Ormai da qualche anno nel nostro Istituto ci occupiamo di « testare » *in vivo* sull'animale da esperimento o sul volontario sano formulazioni di tipo *sustained release*. I tipi di farmaci che abbiamo maggiormente studiato sono i nitrati organici e gli antireumatici non steroidei.

Descriviamo qui brevemente alcuni studi cinetici eseguiti con questi farmaci.

1) *Nitrati organici*. - A questa classe di farmaci appartengono molecole come la nitroglicerina (TNG) e l'isosorbide dinitrato (ISD), largamente utilizzate nel trattamento dell'angina pectoris. In Fig. 1, viene riportato un cromatogramma esemplificativo della metodica gascromatografica utilizzata per la determinazione dei nitrati organici. In Tab. 2, sono riportati i principali parametri analitici. Questa metodica è estremamente specifica e sensibile ed è stata descritta ed utilizzata per la prima volta da Rosseel e Bogaert dell'Università di Ghent [8, 9]. Questo *improvement* di tipo analitico è in parte servito a risolvere la controversia sorta a metà degli anni 70 sulla efficacia o meno dei nitrati organici ed in particolare della TNG somministrata per via orale in formulazioni di tipo *sustained release*.

Tabella 1. - « Systems » terapeutici.

PRODOTTO	Tecnica di rilascio	Velocità di rilascio
Pilocarpina	Diffusione attraverso membrane dense	20-40 µg/ora per 1 settimana
Progesterone . . .	Diffusione attraverso membrane dense	65 µg/die per 1-2 anni
Scopolamina . . .	Diffusione attraverso membrane porose	140 µg in 6 ore poi 5 µg/ora sino al 3° giorno
Metoprololo . . .	Diffusione attraverso pompe osmotiche	19 mg/ora

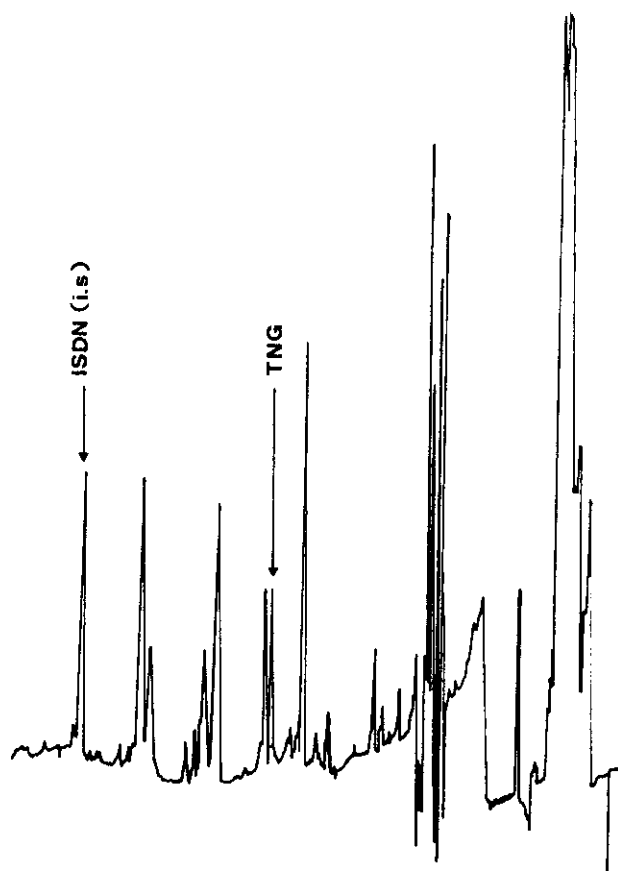


FIG. 1. - Cromatogramma di un estratto plasmatico contenente 1 ng di TNG e 5 ng di ISD come standard interno

Tabella 2. - Parametri gascromatografici utilizzati nella determinazione dei nitrati organici.

— Apparatus: C. Erba Fractovap 2900 – capillary column ¹ / ₆ C 63
— Detector: ecd, Ni (10mCi)
— Colum: SE 52 (MEGA), 15 m × 0.32 mm i.d., 0.4–0.45 μm film thickness
— Oven: 60° C 39.9° C/min 150° C 39.9° C 200° C
2 min 5 min 12 min
— injector/detector: 175° C/225° C
— Gas flow: carrier, He 3 ml/min – Scavenger: N. 40 ml/min
2 2
— Pulse width: 1 μs Voltage: 50 V constant period
Splitting ratio: 1:20 Splittless: 15 sec
— Recorder: 1 mV Zero: 1.22 nA Ch. speed: 1 cm/min

Alcuni autori, come Needelman [10, 11] negavano ogni efficacia clinica a causa della veloce ed intensa inattivazione epatica (*first pass effect*) a cui vanno incontro i nitrati organici quando somministrati per via orale, mentre altri autori [12, 13] sulla base di studi clinici contraddicevano questo punto di vista. Al momento attuale possiamo ritenere accertata l'efficacia clinica dei nitrati dopo somministrazione per via orale [14].

Nella Fig. 2, sono riportate le curve seriche dopo somministrazione in cross-over a 6 volontari sani rispettivamente di 0,6 mg di TNG per via sublinguale (1)

(1) Trinitrina (B) (C. Erba).

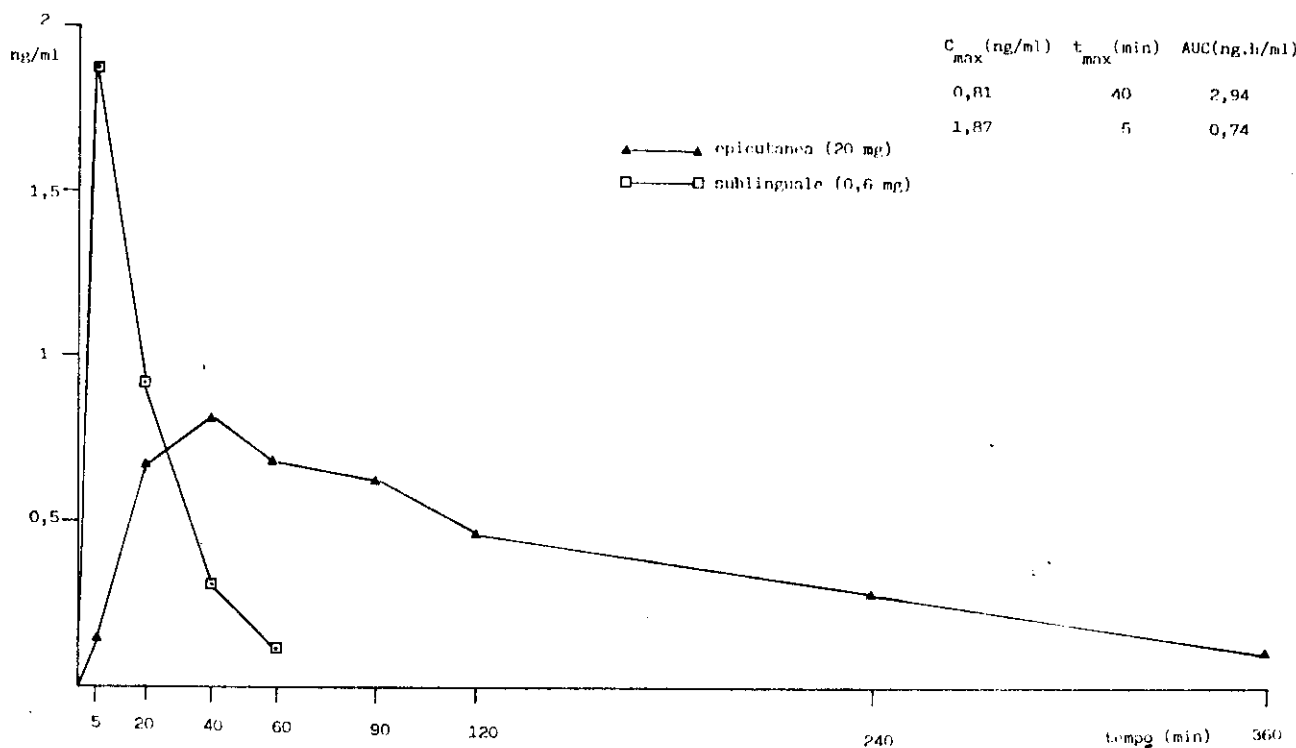


FIG. 2. - Trinitroglicerina nell'uomo. Livelli serici medi (somministrazione in cross-over, n = 6)

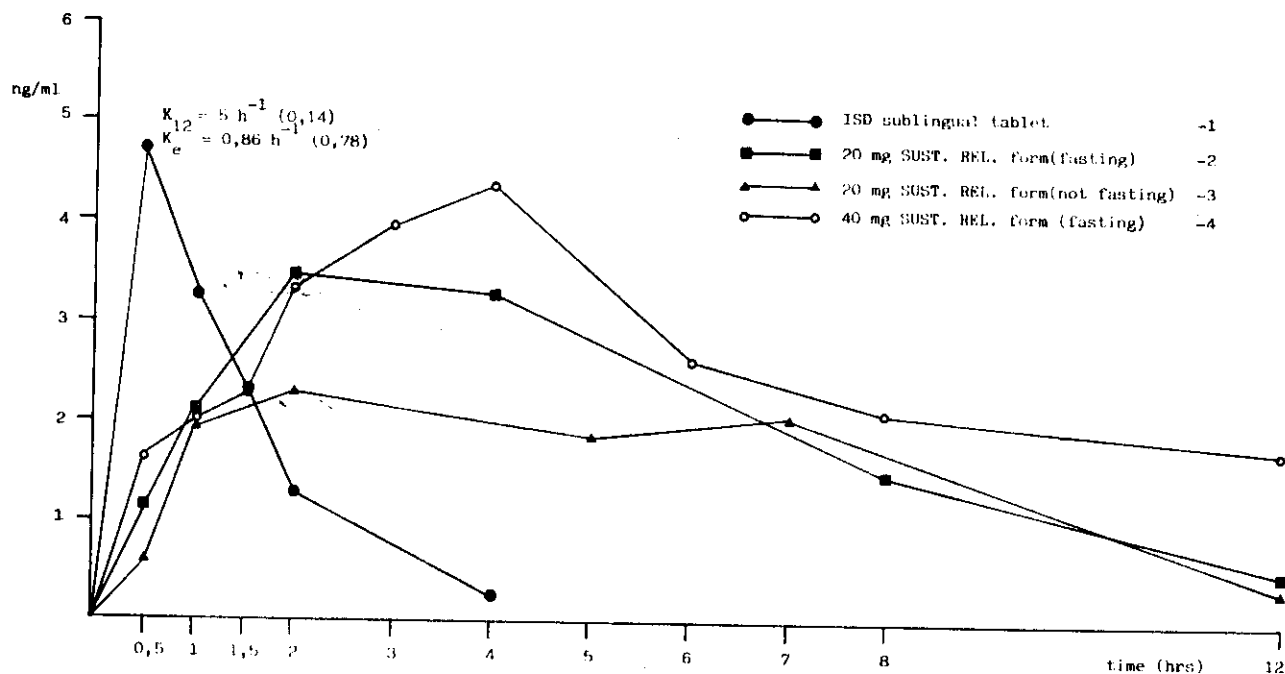


FIG. 3. - Isosorbide dinitrato. Livelli plasmatici medi (studio in *cross-over* su sei soggetti)

e 20 mg di TNG per via epicutanea (2). Si può notare come, dopo somministrazione sublinguale, che è stata per lungo tempo la sola via di utilizzo per questo farmaco, si ottenga una cinetica caratterizzata da un assorbimento estremamente rapido e da una successiva altrettanto rapida fase di eliminazione. È chiaro che questa somministrazione rimane indispensabile nel caso di attacchi anginosi acuti; è altrettanto evidente che essendo l'angina pectoris una malattia cronica diventa del tutto giustificata la ricerca di formulazioni capaci di fornire una copertura terapeutica che non si può assolutamente ottenere con la somministrazione sublinguale.

A questo proposito, è molto interessante la curva serica ottenuta dopo somministrazione epicutanea riportata in Fig. 2. Curve non troppo dissimili sono state ottenute da noi e da altri autori [15], dopo somministrazione per via orale di formulazioni ritardo di TNG.

Nella Fig. 3, sono riassunti i risultati di uno studio sul volontario sano dopo somministrazione in Isosorbide dinitrato per via sublinguale con una formulazione in compresse (1) e per via orale con una formulazione in capsule (2) tipo *sustained release*. Lo studio è stato eseguito secondo un disegno di *cross-over*. In Fig. 4, sono riportati i livelli dei principali metaboliti dell'ISD, i mononitrati che sono stati determinati con la stessa metodica analitica utilizzata per il farmaco inalterato.

Dall'esame delle curve seriche medie della Fig. 3, risulta evidente che i livelli di ISD nel siero dopo somministrazione della formulazione ritardo si mantengono per un tempo piuttosto lungo, superiore alle 12 ore, per cui è largamente prevedibile un effetto farmacologico di lunga durata. Inoltre, l'eliminazione del picco iniziale caratteristico della via sublinguale avrebbe dovuto portare ad una riduzione degli effetti collaterali (in questo caso la cefalea).

In effetti, la somministrazione della formulazione ritardo dosata a 20 mg ai soggetti non digiuni non ha

evidenziato a differenza di tutte le altre somministrazioni, alcuna comparsa di cefalea.

I dati della Fig. 3, relativi alle somministrazioni ritardo, furono sottoposti ad analisi compartimentale mediante l'uso del calcolatore. Il modello scelto è stato quello di un'infusione con una costante di trasferimento di ordine zero al compartimento corporeo ed una costante di eliminazione del primo ordine da tale compartimento. In Fig. 3, è descritta l'equazione per la determinazione dei livelli serici nel compartimento insieme ad alcuni parametri farmacocinetici.

Dalla Tab. 3 si deduce che la costante di trasferimento di ordine zero, K_0 , raddoppia il suo valore passando da 7,47 mg/h nel caso della somministrazione delle capsule da 20 mg ad un valore di 15,03 mg/h nel caso della somministrazione delle capsule da 40 mg. Questo può significare che l'andamento di rilascio del farmaco e il suo trasferimento al compartimento corporeo non è modificato dall'aumento del numero dei *pellets* attivi. Considerando il parametro AUC (area sottesa alla curva serica) si ottiene una disponibilità media per la formulazione di 40 mg del 164 % relativamente alla preparazione da 20 mg, cioè dose per dose dell'82 %. Sempre confrontando il parametro AUC, è interessante sottolineare come la presenza di cibo nello stomaco non diminuisca di molto la biodisponibilità della formulazione da 20 mg.

Il fatto che dopo somministrazione della capsula da 40 mg si ottengano ancora alla 12^a ora valori di ISD di circa 2 µg/ml di siero ha suggerito l'idea di intraprendere uno studio cinetico con somministrazioni ripetute, una capsula ogni 12 ore, per 5 giorni al fine di verificare la comparsa di eventuali fenomeni di accumulo. Lo studio, che è già stato pubblicato [16], non ha evidenziato fenomeni di accumulo sia del farmaco inalterato (ISD) sia dei principali metaboliti.

(2) Nitro-bid (R) (Marion).

(1) Carvasin (R) (Ayerst).

(2) Surecaps (R) (Pharmatec).

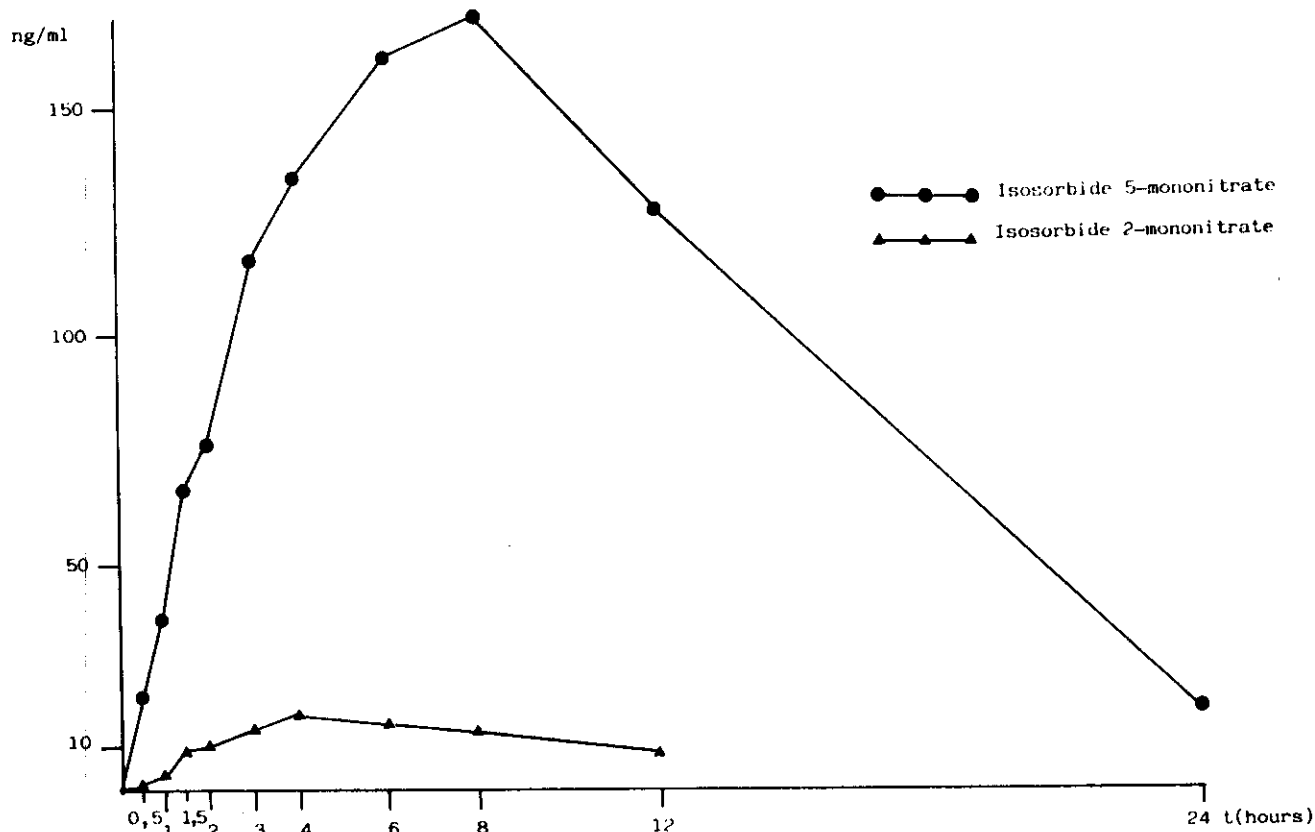


FIG. 4. - Metaboliti dell'ISD. Livelli plasmatici medi ($n = 6$) dopo somministrazione di 40 mg di ISD *sustained release*

Tabella 3. - Parametri farmacocinetici relativi alle curve di Fig. 3.

	1	2	3
K_0 (mg/h)	7,47	7,81	15,03
K_e (h^{-1})	0,22	0,16	0,12
$t_{1/2}$ (h)	3,15	4,33	5,77
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	27,19	24,37	44,58
Cl (lt/min)	12,26	13,68	14,96
T_{end}	2,70	2,60	2,70
$C_p(t) = \frac{K_0}{V \cdot K_e} (1 - e^{-K_e t}) \cdot e^{-K_e t}$			

D'altra parte, occorre riferire che in un recentissimo studio [17] alcuni autori dopo somministrazioni ripetute di diverse formulazioni di ISD a pazienti ospedalizzati hanno trovato che le concentrazioni plasmatiche del farmaco aumentavano con il tempo, e questo potrebbe indicare che i processi di biotrasformazione epatica possono essere di tipo saturabile.

2) *Antinfiammatori non steroidei*. - Numerosi sono gli studi eseguiti nel nostro istituto con molecole appartenenti a questa classe terapeutica. A titolo d'esempio riportiamo i risultati di uno studio eseguito con formulazioni microincapsulate di Ibuprofen. Ci è sembrato questo un esempio particolarmente significativo,

poiché per questa sperimentazione la collaborazione tra il laboratorio galenico e il gruppo di farmacocinetica è iniziata fin dalle fasi iniziali del progetto.

L'Ibuprofen da un punto di vista farmacocinetico è ben assorbito quando somministrato per via orale. Il picco serico è raggiunto tra 1 e 2 ore dalla somministrazione sia in diverse specie animali che nell'uomo [18]. Dopo l'assorbimento, il farmaco è rapidamente eliminato con un tempo di semivita, che nell'uomo è di circa 2 ore [19]. D'altra parte, studi condotti nel nostro Istituto su alcuni primati (Babbuino e Cynomolgus) hanno indicato che la cinetica di assorbimento e di eliminazione è molto simile a quella dell'uomo. Da un punto di vista terapeutico, il fatto che la molecola sia eliminata piuttosto rapidamente implica la necessità di somministrazioni giornaliere ripetute, con una mancata copertura terapeutica nelle prime ore del mattino. Inoltre, le concentrazioni elevate che si ottengono al picco potrebbero contribuire ad accentuare alcuni effetti collaterali che sono caratteristici di questa classe di farmaci. Questi sono alcuni dei motivi che hanno condotto allo sviluppo di formulazioni « ritardo » di Ibuprofen. Il piano sperimentale utilizzato nel nostro studio è stato il seguente:

- preparazione da parte del laboratorio galenico di un certo numero di formulazioni microincapsulate (1) di Ibuprofen aventi differenti tempi di rilascio *in vitro*;
- sulla base della somiglianza cinetica tra i primati e l'uomo condurre uno studio preliminare sommini-

(1) Surecaps (R) (Pharmatec).

strandendo in *cross-over* ad un gruppo di scimmie *Cynomolgus* le formulazioni ritardo in confronto con una preparazione a cessione immediata (2);

- scegliere sulla base di precisi parametri farmacocinetici, la formulazione ritardo più interessante e provarla su di un gruppo di volontari sani nuovamente in confronto con una preparazione pronta.

Per la determinazione dei livelli serici di Ibuprofen, è stato utilizzato un metodo gascromatografico messo a punto nel nostro laboratorio e già pubblicato [20].

In Tab. 4, è riportato l'elenco delle formulazioni utilizzate nello studio con i differenti tempi di rilascio del principio attivo, mentre in Tab. 5, è indicato lo schema utilizzato nella fase di *screening* sull'animale. Nella Fig. 5, si possono vedere le curve seriche medie ottenute dopo le diverse somministrazioni.

I parametri cinetici considerati per la scelta della formulazione sono quelli classici utilizzati in questo tipo di studio e sono stati raccolti nella Tab. 6.

Tabella 4. - *Rilascio percentuale in vitro dell'Ibuprofen.*

	Forme «Ritardo»				Forma «Pronta»
	A	B	C	D	E
Dopo 1 ora ...	7,7	20,2	25,2	26,4	58,8
Dopo 2 ore ...	22,9	35,4	41,6	42,8	82,6
Dopo 4 ore ...	53,0	62,6	68,5	68,5	95,4
Dopo 6 ore ...	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabella 5. - *Ibuprofen. Schema di cross-over su scimmie Cynomolgus. Dose: 30 mg.*

ANIMALE n.	Peso (Kg)	Sesso	Trattamento				
			1°	2°	3°	4°	5°
1	2,5	M	A	B	C	D	E
2	3,4	M	B	C	D	E	A
3	3,1	F	C	D	E	A	B
4	2,5	F	D	E	A	B	C

Tabella 6. - *Ibuprofen. Parametri farmacocinetici delle formulazioni utilizzate nello studio.*

	E	A	B	C	D
AUC (mg.h/ml)	0,52	0,67	0,71	0,59	0,62
t (h) max	1,00	5,00	1,00	1,50	1,50
c max (ug/ml).	174,30	60,40	128,10	137,40	149,90
Biod. relativa..	1,00	1,29	1,37	1,13	1,20

Dall'esame dei parametri cinetici è venuta la scelta per la formulazione A, che è stata quindi testata su un gruppo di 8 volontari sani. Alternativamente, ai soggetti volontari sono state somministrate 2 com-

(2) Brufen ^(B) (Formenti).

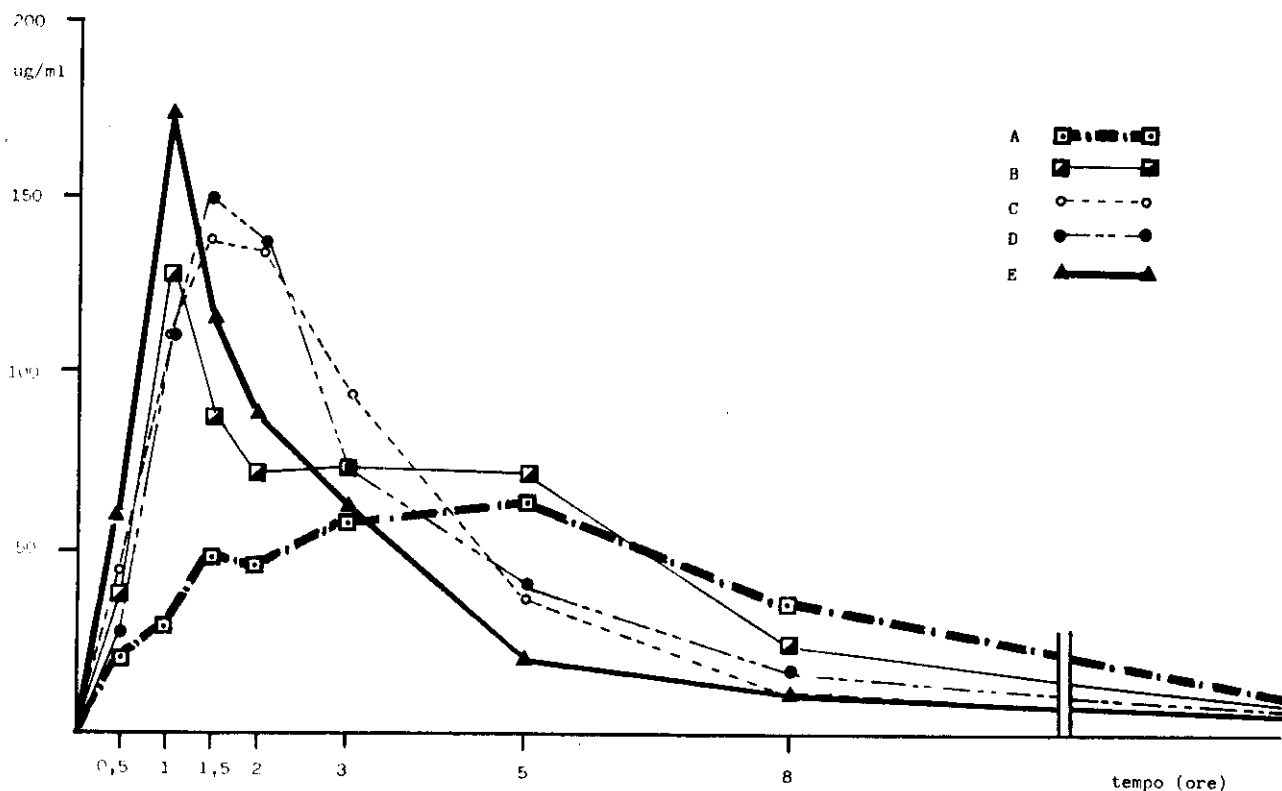


FIG. 5. - *Ibuprofen ritardo su scimmia. Livelli serici medi (n = 4)*

presse della forma pronta a distanza di 5 ore una dall'altra, e 2 capsule della forma ritardo A in un'unica somministrazione. Entrambe le forme erano dosate a 300 mg di principio attivo. In Fig. 6, sono riportate le curve seriche medie dall'esame delle quali si può dedurre la buona biodisponibilità della forma ritardo. In Fig. 7, sono riassunti i risultati di uno stu-

dio eseguito su 8 volontari sani con somministrazioni ripetute della forma ritardo A dosata a 400 mg. Le somministrazioni eseguite a distanza di 12 ore per 7, giorni non hanno portato a fenomeni di accumulo. I risultati estremamente positivi ottenuti ci permettono di affermare che il disegno sperimentale utilizzato rappresenta un approccio razionale e scientifi-

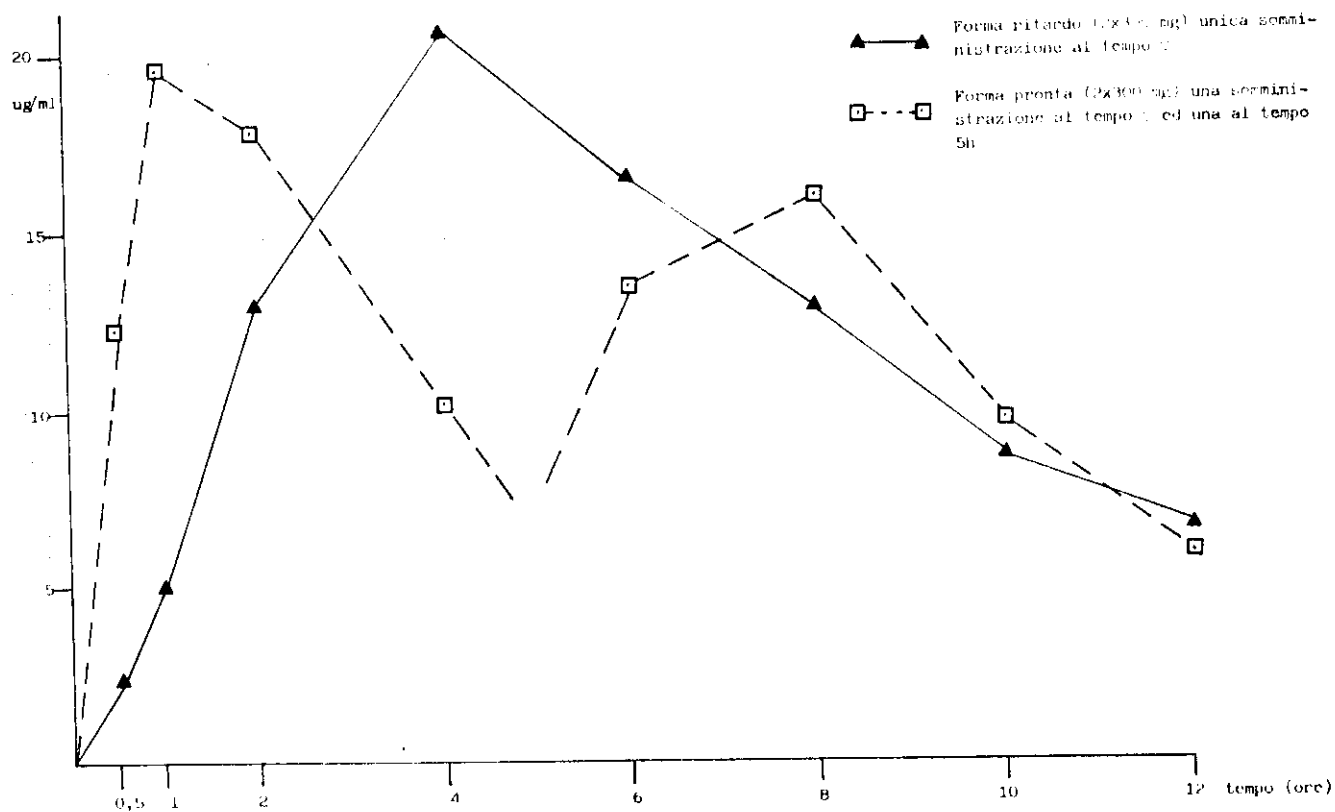


FIG. 6. - Ibuprofen nell'uomo. Studio in *cross-over* su 8 soggetti (4M + 4F). Livelli serici medi

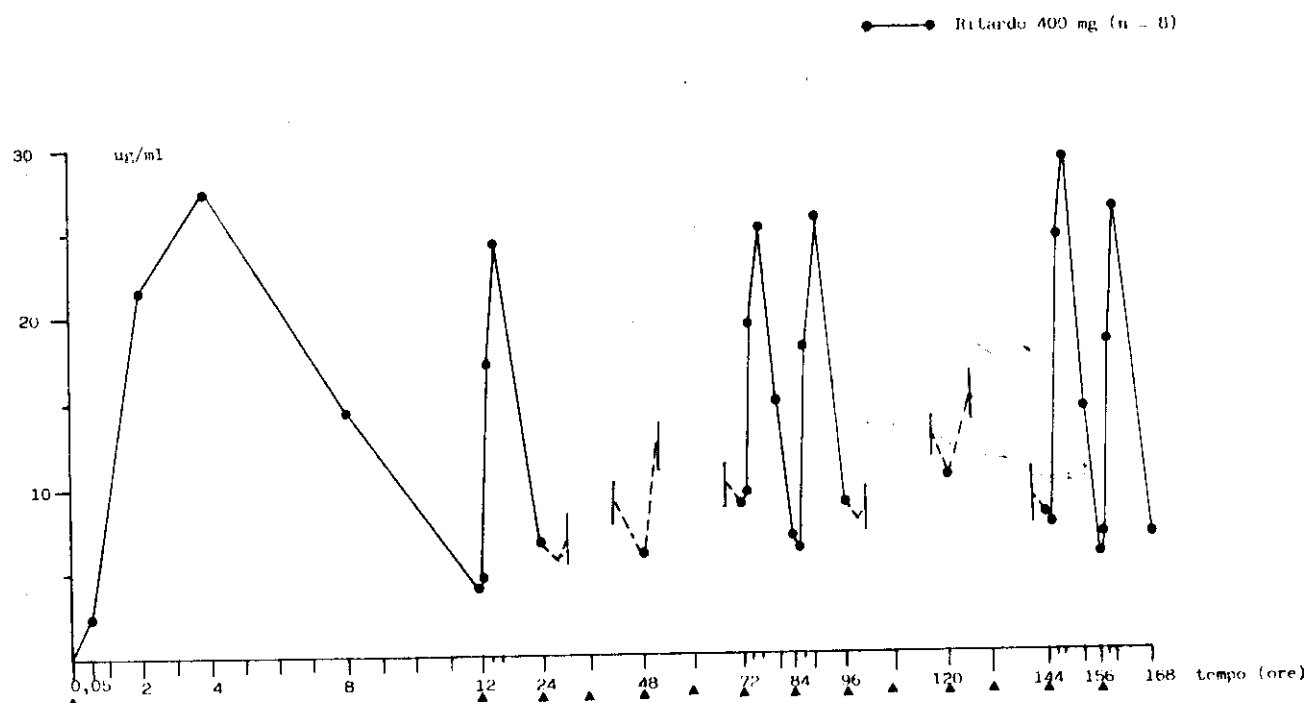


FIG. 7. - Ibuprofen nell'uomo. Somministrazioni ripetute. Livelli serici medi

camente corretto nello sviluppo di una formulazione ritardata sino alle soglie delle prove cliniche controllate.

CONCLUSIONI.

I dati presentati in questa relazione confortano la nostra opinione sull'importanza degli studi di farma-

cocinetica nello sviluppo dei *Drug Delivery Systems*. Intanto perché il profilo «ritardato» del farmaco e quindi la sua prolungata durata d'azione deve essere ben dimostrata *in vivo* sulla base di precisi parametri farmacocinetici, quali il C_{max} , T_{max} e l'AUC. E questa conoscenza del profilo «cinetico» *in vivo* diventa di fondamentale importanza qualora si abbia a che fare con principi attivi, per i quali il range tra livelli inefficaci e livelli tossici è stretto.

BIBLIOGRAFIA

1. JAMINET, F. 1981. Exigences d'ordre technique et legal pour les formes à action prolongée. *Abstracts 1st European Congress of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. Clermont-Ferrand, April 1981, pp. 60-70.
2. URQUHART, J. 1980. Pharmacokinetics—one user's perspective. *Federation Proc.* **39**: 2460-2464.
3. URQUHART, J. 1982. Rate-controlled drug dosage. *Drugs*. **23**: 207-226.
4. URQUHART, J. 1975. Novel methods of ocular drug delivery. *Proceedings of the 6st International Congress of Pharmacology*. Helsinki, pp. 63-67.
5. SHAW, J. & URQUHART, J. 1980. Programmed, systemic drug delivery by the transdermal route. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1**: 208-211.
6. THEEUWES, F. 1975. Elementary Osmotic Pump. *J. Pharm. Sci.* **64**: 1987-1991.
7. MARIANI, L. 1981. Problemi di biodisponibilità: «Forme pronte» — «Forme ritardo». *Farmaci*. **5**: 525-545.
8. BOGAERT, M. G. & ROSSEEL, M. T. 1972. Plasma levels in man of nitroglycerin after buccal administration. *J. Pharm. Pharmacol.* **24**: 737-738.
9. ROSSEEL, M. T. & BOGAERT, M. G. 1979. Simultaneous determination of isosorbide dinitrate and its mononitrates in human plasma by capillary column GLC. *J. Pharm. Sci.* **68**: 659-662.
10. NEEDELMAN, P. 1976. Organic nitrate metabolism. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**: 81-93.
11. NEEDELMAN, P. 1976. Letter to the Editor: efficacy of long acting nitrates: sublingual versus oral administration. *Am. J. Cardiol.* **38**: 400.
12. KRANTZ, J. J. & LEAKE, C. D. 1976. Reply to Needelman letter to the editor. *Am. J. Cardiol.* **38**: 401.
13. WINSOR, T. & BERGER, H. J. 1975. *Am. Heart J.* **90**: 611.
14. PARRAT, J. R. 1979. Nitroglycerin—the first one hundred years: new facts about an old drug. **31**: 801-809.
15. MAIER-LENZ, H., RINGWELSKI, L. & WINDORFER, A. 1980. Pharmakokinetik und relative Bioverfügbarkeit einer Nitroglycerin-Salbezubereitung. **30**: 320-324.
16. SEGRE, G., ZANOLO, G., MONDINO, A., GIACHETTI, C. & SILVESTRI, S. 1981. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von 2 verschiedenen Retard Formulierungen mit 40 mg Isosorbiddinitrat. *Fortschr. Med.* **99**(4748): 2008-2013.
17. BRUYNEEL, K., ROSSEEL, M. T. & BOGAERT, M. G. 1982. Plasma concentrations of isosorbide dinitrate and mononitrates after acute and chronic oral administration of isosorbide dinitrate in man. *Arzneim. Forsch.* **32**: 769-773.
18. ADAMS, S. S., CLIFFE, E. E. & NICHOLSON, J. S. 1967. Kinetics of pharmacologic activity of Succinylcholine in man. *J. Pharm. Sci.* **56**: 1686-1688.
19. COLLIER, P. S., D'ARCY, P. F., MARROW, D. W. G. & MORROW, N. 1978. Pharmacokinetic modelling of Ibuprofen. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **5**: 528-529.
20. ZANOLO, G., MONDINO, A., GIACHETTI, G., HAASE, W., ENGELS, B., TESTAGUZZA, F. & WAGENER, H. H. 1982. Humankinetische Untersuchungen mit Ibuprofen. *Therapiewoche*. **32**: 4353-4358.

RICERCHE E METODOLOGIE

Rischio di intossicazione da dimetilformamide in una fabbrica di pelle sintetica

A. PAOLETTI e A. IANNACCONE

Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università Cattolica, Roma

Riassunto. - In una fabbrica di pelle sintetica poliuretanica sono stati condotti rilievi epidemiologici ed ambientali. Disturbi dispeptici, diarrea ed intolleranza all'alcool sono i principali sintomi riscontrati nel gruppo di lavoratori esposti alla dimetilformamide.

Summary (Toxicity hazard in a plant producing a synthetic leather). - Epidemiological and environmental surveys were effected in a plant producing a poliurethanic leather. Dyspepsia, diarrhoea and alcohol intolerance were the main symptoms found in workers exposed to dimethylformamide.

L'uso della dimetilformamide (DMF) come solvente industriale si è andato sempre più estendendo specie nei settori chimico-farmaceutico, petrolchimico, tessile e conciario. Parallelamente lo studio della sua tossicità si è arricchito di osservazioni sperimentali e sull'uomo capaci di tratteggiarne con sufficiente precisione i possibili effetti acuti, ma non ancora soddisfacenti per definire quelli da esposizione prolungata.

Ancora agli inizi degli anni '60 qualificati testi di medicina del lavoro e di tossicologia industriale riconoscevano questo solvente; a tutt'oggi la legislazione italiana in materia di prevenzione ed assicurazione delle malattie professionali non nomina nelle rispettive tabelle la sostanza, ovvero la categoria, le amidi, cui essa appartiene.

Nell'intento di apportare un contributo allo studio del rischio di tossicità per esposizione cronica alla DMF, riportiamo i rilievi ambientali ed epidemiologici condotti in una fabbrica che produce una finta pelle scamosciata, utilizzando tale solvente in una parte del ciclo lavorativo (1).

CICLO PRODUTTIVO.

La fabbrica, un moderno complesso industriale, produce una originale e, nel suo genere, pregiata finta pelle scamosciata, i cui costituenti base sono un poliestere ed un poliuretano. Il prodotto finito trova mercato nei settori dell'abbigliamento e dell'arredamento.

Il ciclo produttivo si articola in tre distinti reparti:

- reparto di agofeltratura, dove una fibra sintetica poliestericata è sottoposta a sballaggio, sfioccatura, cardatura ed agofeltratura, fino alla formazione di un rotolo di tessuto non tessuto (feltro);

- reparto dei trattamenti chimici, dove il vello agofeltrato è trasformato in pelle grezza mediante bagni successivi in un collante idrosolubile, in un solvente clorurato ed in una soluzione dimetilformamide-poliuretano (DMF-PU), la quale resina si coagula sul poliestere dando corpo al prodotto. Le tre linee citate sono alloggiate in ambienti adiacenti ma distinti. Seguono le operazioni di camosciatura;

- reparto tintoria, dove la pelle grezza viene tinta, rifinita ed avviata al confezionamento.

Completano la fabbrica alcuni reparti o lavorazioni accessorie: la manutenzione elettrica e meccanica, la centrale termoelettrica, il trattamento acque, il recupero solventi, il laboratorio controlli ed un piccolo impianto per la sintesi del poliuretano.

RILIEVI AMBIENTALI.

Nel presente lavoro restringiamo l'interesse alla sola linea dove è presente e nettamente prevalente il rischio da DMF. In essa si distinguono due sezioni, una di preparazione della soluzione (A) ed una di impregnazione della pezza (B).

(A). La zona di preparazione è un locale di circa 80 m², alto 5 m, alloggiante il serbatoio miscelatore al quale, in ciclo chiuso, giunge la soluzione DMF-PU e nel quale gli operatori versano degli additivi (antiossidanti, stabilizzanti, adsorbenti, ecc.) attraverso

(1) I dati tecnologici, epidemiologici ed ambientali riportati nel presente lavoro si riferiscono all'incirca ai primi due anni di esercizio dell'impianto; in particolare quelli epidemiologici sono stati raccolti nell'arco di 18 mesi e quelli ambientali nel corso di alcuni mesi successivi alla chiusura dei dati biostatistici. Dopo tali indagini l'Azienda ha provveduto ad apportare miglioramenti sostanziali al processo ed alle condizioni di lavoro. Sul tipo di prevenzione attuata e sui successivi rilievi effettuati è nostra intenzione stendere una seconda nota.

un passo d'uomo che viene aperto in genere una sola volta per turno per alcuni minuti. Le operazioni di carica sono svolte con maschera antigas. Gli operatori stazionano nel locale mediamente 60 minuti per turno.

Le determinazioni ambientali della DMF (eseguite dal Laboratorio di Igiene e profilassi, Reparto chimico, MESOP di Terni), sono sintetizzate nella Tab. 1. Si può affermare, in accordo con la valutazione soggettiva del gruppo, che in prossimità dell'apparato di caricamento esiste sempre una contenuta presenza di vapori di DMF, che sale bruscamente durante la carica; il ritorno a valori « accettabili » è rapido grazie alla brevità dell'operazione ed alla buona ventilazione dell'ambiente. (Ricordiamo che il TLV-TWA dell'ACGIH per il 1979 è di 30 mg/m³ o 10 ppm e il TLV-STEL è di 60 mg/m³ o 20 ppm).

Tabella 1. - *Rilievi ambientali di DMF (mg/m³) in preparazione.*

PUNTI DI PRELIEVO	Passo chiuso Passo aperto	
Vicino al serbatoio	13,0	23,8
A 3 m dal serbatoio	9,2	10,0
Durante la carica presso il boccaporto	—	204,0
Subito dopo la carica	23,8	—

(B). La zona impregnazione è un ampio locale a sviluppo longitudinale, alloggiante la vasca dove scorre a ciclo chiuso la pezza nella soluzione DMF-PU. Si possono configurare schematicamente tre situazioni tipo. La prima, in cui tutto procede normalmente e gli operatori controllano dall'esterno l'andamento del processo, effettuando periodici prelievi della soluzione mediante l'apertura del ciclo sotto protezione individuale con maschera e guanti. La seconda situazione è quella degli interventi programmati di apertura del ciclo per la pulizia della vasca e la manutenzione interna. Ciò avviene mediamente una volta per mese, ma nei primi tempi ha toccato frequenze un po' più alte: dopo 12 ore di lavaggio con DMF il solvente è scaricato in serbatoio chiuso, il ciclo viene aperto, gli operatori entrano con protezione integrale e puliscono le superfici con degli stracci; l'operazione dura circa tre ore e mezzo, con opportune pause intervallate. La terza situazione è quella degli interventi straordinari di apertura del ciclo, quando la pezza perde la guida di scor-

rimento e genera una rolla. Ciò avviene mediamente una volta per mese od anche meno, ma nei primi tempi la frequenza è stata assai più alta: in tale frangente la produzione viene interrotta, il ciclo è aperto, la soluzione DMF-PU è fatta scolare, gli operatori, con protezione integrale, tagliano la rolla, raggiungono i capi della pezza e riattivano l'impianto; il tempo medio di intervento varia dai 15 ai 40 minuti per due operatori.

Le determinazioni ambientali della DMF sono sintetizzate nella Tab. 2. Nella condizione di normale esercizio si evidenziano valori relativamente bassi ovunque, eccetto presso un vaso di raccolta (aperto) e durante l'apertura della vasca per i prelievi. Nel corso della programmata manutenzione i valori di centro ambiente tendono ad alzarsi, pur rimanendo al di sotto del TLV-TWA ovunque; un'ora dopo la chiusura del ciclo si ripristinano i valori di normale esercizio, con l'eccezione del livello vasca. Condizioni francamente anormali, invece, si generano durante la rollatura, ove sono registrati, rispetto al normale esercizio, degli incrementi medi nei gruppi di piazzette di rilevamento tra loro omogenee che vanno dai 10 ai 70-80 mg/m³. Nel punto più critico si evidenziano punte fugaci di 549 mg/m³; dopo un'ora dalla riattivazione del ciclo i valori ambientali si distribuiscono entro un range compreso tra 2,2 e 26,9 mg/m³, con l'eccezione del livello vasca; tuttavia l'inquinamento di fondo del reparto resta aumentato, con incrementi medi nei gruppi di piazzette omogenee di 2-9 mg/m³.

RILIEVI EPIDEMIOLOGICI.

Nello stabilimento lavorano 264 persone, di cui 256 uomini ed 8 donne, le quali sono addette all'ispezione terminale del prodotto e al confezionamento. L'età media di 28,7 anni e l'anzianità lavorativa media di 2,2 anni sono pressoché uniformi in tutti i reparti. Il 48,5 % dei lavoratori è impegnato nei tre reparti di produzione, il resto nei reparti o nelle lavorazioni accessorie. Risultano esposti direttamente al rischio da DMF 27 soggetti (10,2 %), dei quali 4 in preparazione, 10 in impregnazione ed inoltre 5 capituono, il capo-reparto e 7 addetti alla manutenzione, che operano prevalentemente ma non esclusivamente nella linea considerata. Altri 24 lavoratori (9 %), impiegati nelle linee contigue, possono considerarsi esposti solo occasionalmente.

I rilievi biostatici che esponiamo (Tab. 3), sono la sintesi dei dati raccolti nel corso dei primi 18 mesi

Tabella 2. - *Rilievi ambientali di DMF (mg/m³) in impregnazione.*

PUNTI DI PRELIEVO	Lavoro normale	Pulizia vasca		Rollatura	
		in atto	1 h dopo	in atto	1 h dopo
Centro ambiente ed altri 13 punti	0-6	0,2-12,4	0-5,4	8,1-172	2,2-26,9
Livello vasca	4,2	34,2	11,5	549	44
Vaso di raccolta (aperto)	36	5,4	3,1	70,6	12,5
Zona di apertura vasca per prelievo	66	24,4	12,5	98	13,6

Tabella 3. - *Rilievi biostatistici sul gruppo di 27 lavoratori con esposizione diretta alla DMF.*

RILIEVO	Incidenza	Significatività (a)
Dispepsia gastroduodenale ...	15 (55,5 %)	$p < 0,05$
Alvo sciolto o diarroico	10 (37 %)	$p < 0,01$
Intolleranza all'alcool	8 (29,6 %)	$p < 0,01$
Turbe psiconevrotiche	5 (18,5 %)	n. s.
Altri sintomi (cefalea, ecc.) ..	1-6 (3,7-22 %)	n. s.
E. O. alterato (epatomegalia, ecc.)	0-6 (0-22 %)	n. s.
Analisi epatiche alterate	2 (7,4 %)	n. s.
Altre analisi alterate (emocromo, ecc.)	0-1 (0,3-7 %)	n. s.
Spirografia alterata	1 (3,7 %)	n. s.

(a) Le differenze, testate con χ^2 o col metodo di Fisher, si intendono vs controlli costituiti dagli altri lavoratori della fabbrica (237 unità) e dal gruppo degli esposti occasionalmente alla DMF (24 unità).

del nostro intervento sanitario, articolatosi su tutta la popolazione della fabbrica con visite mediche, questionari, esami spirometrici ed analisi (emocromo, piastrine, fragilità vascolare, transaminasi GO e GP, glutamyltranspeptidasi, fosfatasi alcalina, bilirubinemia totale, azotemia, glicemia ed esame chimico delle urine). Non abbiamo ancora dati sull'escrezione urinaria di N-monometilformamide, principale metabolita del solvente.

Turbe dispeptiche, alvo irregolare e reazioni di intolleranza all'alcool sono i principali disturbi accusati nel gruppo a rischio con esposizione continua alla DMF.

Le turbe dispeptiche sono state descritte come spiacevoli sensazioni di « stomaco gonfio » anche a distanza dai pasti, spesso accompagnate da fitte dolorose epigastriche e/o da pirosi ed accentuate dalla sgradevole inalazione del solvente; le turbe della funzione intestinale come ricorrenze periodiche di alvo sciolto o francamente diarroico, specie dopo le operazioni lavorative più inquinanti (rollatura, ecc.); le reazioni di intolleranza all'alcool (Antabuse simili) come occasionali *flushes* cutanei al volto e al torace, che si manifestano generalmente 4-12 ore dopo un'esposizione più marcata alla DMF e dopo 3-20 minuti dall'assunzione di modiche quantità di vino (1 o 2 bicchieri); non sono mai stati riferiti i ben noti segni neurovegetativi di accompagnamento descritti per il Disulfiram. L'unico caso di effetto Antabuse capitato alla nostra diretta osservazione presentava *flush* cutaneo su tutta la zona emozionale con associata modica tachicardia (94/min), e la remissione completa dei sintomi avveniva in 40 minuti. Gli operatori che nel periodo considerato sono stati colpiti da tale sintomo sono otto, tre della zona preparazione, quattro della zona impregnazione ed un meccanico della manutenzione; l'incidenza media *pro capite* è stata di 2,2 volte, con minimi di 1 e massimo di 6.

I tre disturbi descritti appaiono significativamente correlati con il rischio da DMF se si compara il grup-

po in oggetto sia con tutto il resto della popolazione della fabbrica, sia con il gruppo degli esposti a DMF solo occasionalmente. Anche le turbe psiconevrotiche sono risultate frequenti, ma per esse nessuna differenza è emersa dal confronto con i controlli. Di scarso rilievo, al momento, figurano altri sintomi, quali cefalea, nausea, inappetenza, insonnia, secchezza delle fauci, senso di costrizione toracica, irritazione tegumentaria, prurito e dolori addominali a tipo colica, che invece ricorrono in altre casistiche.

All'obiettività clinica non sono scaturiti rilievi particolari, neanche riguardo alla presenza di epatomegalia, Murphy-positività, dimagrimento, segni di alterazioni cardiovascolari o neurologiche, pur descritti da altri AA.

Due i casi di interessamento della funzione epatica: nel primo era presente un lieve rialzo delle transaminasi GO e GP con bilirubinemia totale di 1,3 mg/100 ml, nel secondo un lieve rialzo della sola transaminasi GP, con bilirubinemia totale di 1,2 mg/100 ml; assenti variazioni particolari degli esami ematologici e delle restanti analisi chimico-cliniche.

La valutazione delle spiografie (assieme ai questionari respiratori) non ha evidenziato segni di interessamento dell'apparato in questione.

COMMENTO.

La popolazione considerata, 27 giovani operatori esposti a rischio da DMF da circa 2 anni, lavora in un impianto a ciclo chiuso in situazione di relativa tollerabilità nelle condizioni di normale esercizio; tuttavia le periodiche aperture del ciclo, specie quelle straordinarie, comportano delle sovraesposizioni al solvente talora molto elevate; ne consegue un aumento dell'inquinamento di fondo. In tali frangenti l'uso dei mezzi di protezione individuale spesso non riesce a tutelare adeguatamente gli esposti, tanto che si verificano effetti Antabuse e si accentuano le già diffuse turbe gastroenteriche.

Nella nostra casistica l'effetto Antabuse ha interessato meno di un terzo della popolazione, il che si accorda con i dati di Lyle e Coll. [1], anche nelle modalità con cui il sintomo si è manifestato. Fiorito e Coll. [2], invece, forniscono una prevalenza del sintomo assai superiore, ma più elevata appare l'esposizione ambientale descritta, come tra l'altro confermano la più copiosa presenza di sintomi neurovegetativi di accompagnamento e l'evidente interessamento epatico degli esposti. Che l'interferenza metabolica alcool-DMF avvenga soprattutto ad elevate esposizioni (es. sopra le 50-80 ppm) pare confermato da Eben e Kimmerle [3]; pertanto il rilievo di tale effetto va considerato come spia di abnorme assorbimento del tossico. Essendo probabile che la reazione alcool-DMF sia mediata da un metabolita intermedio [4] che si produce per demetilazione ossidativa microsomiale epatica [3], bene si spiegano le differenze individuali riscontrate.

La variazione dell'alvo in senso diarroico compare raramente in altre casistiche [5], mentre nella nostra è un dato di tutta evidenza e sembra correlarsi soprattutto con le esposizioni di picco. Probabilmente nel suo determinismo giocano un ruolo l'iperperistaltismo stimolato dall'odore disgustoso della DMF e le concomitanti turbe gastroduodenali.

Le turbe dispeptiche da noi riscontrate figurano, invece, in gran parte delle altre casistiche. Esse appaiono collegate non solo con le esposizioni più acute ma anche con quella di base, come dimostrerebbero l'alta percentuale dei colpiti ed il fatto che i lavoratori ne soffrano a lungo anche a distanza dalle esposizioni di picco. L'eliminazione gastrica del solvente [6] ne può spiegare, almeno in parte, la genesi.

La necessità di una migliore tutela ambientale si è così posta con forza nello stabilimento considerato, sia per ovviare ai disturbi descritti, sia per evitare che altri e più seri sopraggiungessero, specie se si accetta la tesi che gli effetti del solvente divengano ingravescenti nel tempo [7]. Oltretutto la modalità di esposi-

zione a DMF del tipo bassi livelli di base con elevati picchi periodici ha già mostrato la sua pericolosità in campo sperimentale [8]. Le bonifiche effettuate, come già prima riferito, non vengono descritte in questa sede. Possiamo comunque concludere che in simili impianti un primo e fondamentale passo avanti sul piano della prevenzione può compiersi riducendo frequenza e intensità degli inquinamenti di picco mediante una ottimale gestione degli impianti ed una razionale programmazione degli interventi di manutenzione.

Si ringrazia il dott. M. Dompè dell'ANIC di Milano per la collaborazione prestata.

Ricervuto il 2 gennaio 1981.

Accettato il 10 gennaio 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. LYLE, W. H., SPENCE, T. W. M., MC KINNELLY, W. M. & DUCKERS, K. 1979. Dimethylformamide and alcohol intolerance. *Brit. J. Indust. Med.* **36**: 63-66.
2. FIORITO, A., GOBBATO, F., CIPOLLA, G. & VOLPE, C. 1979. Indagine clinico-epidemiologica in 102 operai esposti a dimetilformamide in una fabbrica di finte pelli. *Dif. Soc.* **58** (2): 61-72.
3. EBEN, A. & KIMMERLE, G. 1976. Metabolism studies of N, N-Dimethylformamide. III) Studies about the influence of ethanol in persons and laboratory animals. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.* **36**: 243-265.
4. HANASONO, G. K., FULLER, R. W., BRODDIE, W. D. & GIBSON, W. R. 1977. Studies on the effects of N, N-dimethylformamide on ethanol disposition and monoamine oxidase activity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **39**: 461-472.
5. MARTELLI, D. 1960. Tossicologia della dimetilformamide. *Med. Lav.* **51**: 123-128.
6. MASSMANN, W. 1956. Toxicological investigation on dimethylformamide. *Brit. J. Industr. Med.* **13**: 51.
7. PERBELLINI, L., COSTA, G., FAGGIONATO, G., CARNEVALE, F. & D'ANDREA, F. 1973. Patologia professionale da dimetilformamide. *Folia Med.* **56**: 323-339.
8. CLAYTON, H. W., BARNES, J. R., HOOD, D. B. & SCHEPERS, G. W. H. 1963. The inhalation toxicity of dimethylformamide (DMF). *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **24**: 144.

Il calcolatore in medicina come banca di dati

RETA BERNABEI, SILIO D'ANGELO e MARIELLA CONTI

Istituto di Fisica, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - *Presentiamo qui una breve rassegna sulle realizzazioni di data base medici e sui problemi connessi alla loro realizzazione e utilizzo.*

Summary (The Medical Computer as a Data Bank). - *An outline of the establishment of medical data base, as well as of the problems concerning their utilization, is presented.*

INTRODUZIONE.

L'uso del calcolatore nel trattamento dei dati clinici ha assunto negli ultimi anni sempre maggiore importanza, poiché permette ai medici di utilizzare grandi quantità di informazioni non solo per la cura dei pazienti, ma anche per scopi statistici e diagnostici [1-4]. Infatti, le informazioni raccolte nel corso di vari anni, curando molti pazienti, contengono dati potenzialmente rilevanti per la soluzione di molti problemi clinici. Poiché tali dati possono essere utilizzati per scopi differenti, essi vengono strutturati in maniere diverse, secondo le varie esigenze, generando così molteplici modelli di data base.

Per data base si intende una notevole quantità di informazioni che, opportunamente strutturate, vengono memorizzate dal calcolatore per essere successivamente restituite non soltanto nella loro forma originale, ma anche elaborate. L'utilità del data base si evidenzia soprattutto quando le informazioni in esso contenute vengono usate da più programmi e per differenti applicazioni. Infatti, in un data base i dati sono organizzati in modo tale che la loro struttura possa essere opportunamente modificata per ottimizzare l'impiego del calcolatore in base alle esigenze (lavoro, tempo di calcolo, memoria) degli specifici programmi applicativi. Per comprendere meglio cosa sia un data base, consideriamo come esempio il caso di un ospedale che utilizzi un calcolatore in cui i dati raccolti sono classificati in: «dati amministrativi», «dati per servizi di informazione», «dati clinici» e «dati per ricerche mediche». Ebbene tali informazioni non sono indipendenti tra di loro, ma sono correlate; ad esempio, «dati clinici» e «dati per ricerche mediche» non sono indipendenti, in quanto i dati clinici sono utilizzati per eseguire ricerche mediche e, d'altro canto, i dati per ricerche mediche contengono dati clinici. In modo analogo sono correlati «dati clinici» e «dati amministrativi», «dati per servizi di informazione» e «dati per ricerche me-

diche» e così via. Tale situazione è illustrata in Fig. 1. Ogni freccia della Fig. 1 rappresenta una relazione tra i dati, mentre i rettangoli rappresentano i dati che sono organizzati sia in modo che le operazioni di inserzione, prelievo e cancellazione avvengano nel minor tempo possibile, sia in modo che la loro memorizzazione avvenga senza sprechi di memoria. La Fig. 1 rappresenta, perciò, un esempio di data base; si noti quindi che non basta memorizzare i dati perché si possa parlare di data base, infatti essi devono essere prima organizzati. Tale organizzazione non è unica e ciò dipende sia dalla complessità delle informazioni che si devono memorizzare, sia dalle diverse esigenze degli utenti che memorizzano, aggiornano e ricercano i dati e sia, infine, dal tipo di calcolatore utilizzato.

DATA BASE IN MEDICINA.

Prima di analizzare alcune realizzazioni di data base clinici, vogliamo sottolineare, ancora una volta, che le esigenze dei medici operanti nel campo della ricerca clinica computerizzata sono notevoli e ciò ha condotto ad una reale non standardizzazione dei data base. Alcuni programmi applicativi, infatti, richiedono una rapida memorizzazione di grandi quantità di informazioni che verranno successivamente utilizzate per inda-

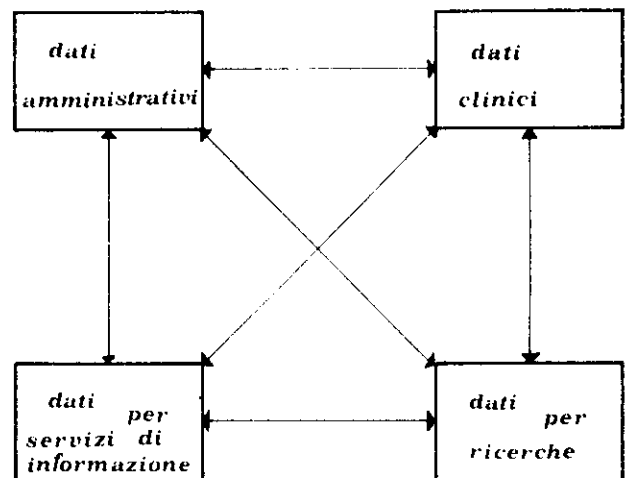


FIG. 1. - Esempio schematico di struttura e relazioni tra dati di interesse ospedaliero

gini statistiche; altri programmi applicativi, invece, richiedono un efficace sistema di monitoraggio real-time dei segni vitali del paziente ed altri ancora, ad esempio, richiedono la raccolta di dati specifici per il trattamento di determinate malattie. Questa molteplicità di esigenze ha generato un gran numero di data base più o meno «specializzati», non essendo stato realizzato ancora un prototipo con tutte le caratteristiche necessarie per l'impiego su larga scala di un data base altamente integrato, flessibile e con ampie capacità di adattamento ad esigenze future. Questa fase ancora sperimentale è tuttavia necessaria, perché, sebbene i programmatori siano in grado di soddisfare pienamente alle domande dei medici, questi non sono in grado di formulare esattamente le proprie richieste senza aver prima provato le nuove possibilità offerte dal trattamento automatico delle informazioni.

Non ci fermeremo qui a presentare le molteplici realizzazioni sviluppate nel recente passato (1), ma ci limiteremo ad esaminare tra i vari data base esistenti, tre modelli in particolare: il Patient Oriented Data base (POD), realizzato nell'ospedale dell'Università di Tokio; il progetto CLINFO, proposto dal National Institute of Health della California ed un modello relazionale. La scelta di questi particolari data base è motivata dal desiderio di accentuare il progressivo tentativo di realizzare una data base con le caratteristiche menzionate in precedenza; infatti, la sequenza dei tre modelli rappresenta in certo qual modo l'evoluzione del data base medico in questi ultimi anni.

IL POD.

Il POD [8] rappresenta il primo passo verso l'automatizzazione di dati clinici e si presenta come un archivio di cartelle cliniche. I dati vengono memorizzati in un file, detto file POD, che è costituito a sua volta da due diversi files: il file di identificazione (ID-file) e il file di dati (DATA-file). L'ID-file contiene quei dati che non devono essere ordinati cronologicamente, quali, per ogni paziente, numero di identificazione, nome, sesso, data di nascita etc; in tale file i records vengono memorizzati adottando la tecnica delle locazioni sequenziali. Il DATA-file, invece, contiene i dati raccolti in un lungo arco di tempo, quali ad esempio, i risultati dei tests e i risultati diagnostici, le medicazioni, etc; i records in tal caso vengono memorizzati adottando la tecnica delle locazioni doppiamente indirizzate. Per rendere, comunque, più rapida la ricerca dei dati il sistema è dotato anche di un accesso random, attraverso un file INDEX che contiene i numeri di identificazione dei pazienti e i puntatori agli ID-records relativi. Così conoscendo il numero di identificazione del paziente è subito individuato l>ID-record relativo e quindi i DATA-records. Tale situazione è schematizzata in Fig. 2.

Per la gestione di pazienti con particolari caratteristiche esiste il file SUBSET, nel quale vengono memorizzati i records dei pazienti selezionati nel file POD. I records contenuti in tale file vengono riordinati secondo regole prefissate, ad esempio o in ordine crescente di età o peso o in ordine decrescente di valori di una determinata analisi; a tale scopo in un file SORT sono memorizzate le chiavi di ordinamento, che hanno puntatori ai records del SUBSET associati. Un semplice

schema riassuntivo del sistema POD può essere allora quello illustrato in Fig. 3.

Per aiutare i medici nella gestione dei dati, inoltre, sono stati realizzati due linguaggi semplici: lo STORE e il QUERY. Il linguaggio STORE è formato dai comandi relativi alla generazione e aggiornamento del file POD, mentre il QUERY comprende i comandi per la manipolazione dei dati che permettono ai medici di ottenere risposte anche a quesiti molto complessi.

IL CLINFO.

Alcuni medici hanno osservato, però, che nella pratica medica i dati relativi a ciascun paziente sono ordinati cronologicamente e che sono usuali raggruppa-

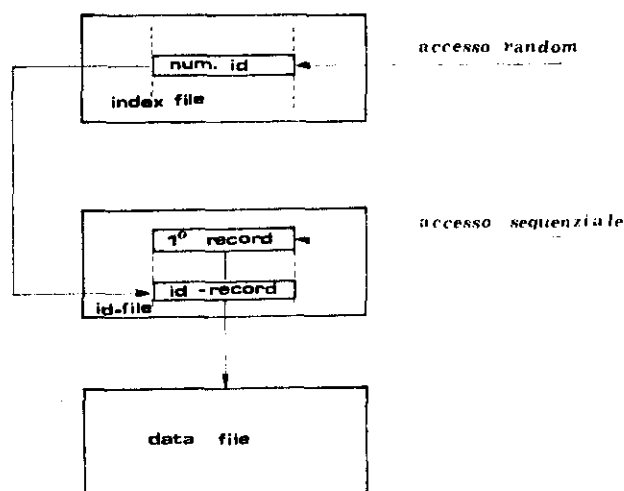


Fig. 2. - Schema di recupero delle informazioni in un file POD

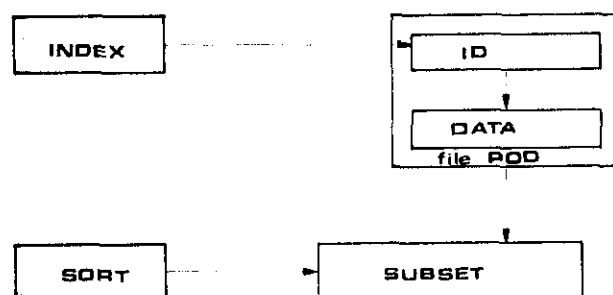


Fig. 3. - Correlazioni tra files con differenti finalità nel data base POD

(1) A Nancy, ad esempio, nell'Ospedale Jean d'Arc è stato realizzato un data base specifico per il trattamento del diabete; presso l'Unità di Medicina Nucleare dell'Istituto G. Ruossi (Villejuif, Francia) è stato realizzato un data base per la valutazione di casi di ipertiroidismo. Nell'Yiddish Laboratory è stato realizzato il data base Y-Lab per la raccolta di dati di Laboratorio, mentre il laboratorio Zamenhoff del Central Clinical Laboratory di Tel Aviv è stato scelto per il progetto pilota. Un ulteriore data base relativo ad informazioni farmaceutiche è stato realizzato a Parigi dalla Commissione di Informatica dell'Ospedale Necker e dal Sindacato dell'industria farmaceutica. Sono stati, inoltre, realizzati anche dei data base da utilizzare on-line per effettuare diagnosi con rapidità ed alta affidabilità: ne sono esempi il MEDAS (Medical Emergency Decisions and Assistance System) impiegato nell'USC Center for the Critically I 11 di Los Angeles ed il WAMIS realizzato presso il centro di calcolo della Facoltà di Medicina della Università di Vienna [4-7].

menti di informazioni relative ad analisi simili (come esempio l'analisi del sangue che raggruppa valori ematocitometrici, tassi di azotemia e glicemia, ecc.), proprio su tale osservazione basa lo sviluppo del progetto CLINFO [9]. Il CLINFO presenta una struttura più complessa del POD, poiché introduce particolari raggruppamenti di informazioni ed indicatori temporali, che caratterizzano le fasi più importanti della storia clinica del paziente. I dati relativi ad ogni paziente sono organizzati secondo una struttura matriciale bidimensionale: le righe di tale matrice contengono i valori delle informazioni raccolte in uno stesso periodo e le colonne i valori delle informazioni raccolte in tempi differenti. A volte risulta utile raggruppare alcune colonne di questa matrice, ottenendo così nuove informazioni e tali raggruppamenti sono differenti a secondo degli studi per cui i dati sono stati richiesti. I dati relativi a tutti i pazienti, dopo essere stati memorizzati temporaneamente nel file di aggiornamento, vengono inviati nel file di analisi. I dati appartenenti a questo file possono essere visti come punti di uno spazio tridimensionale, i cui assi sono rappresentativi rispettivamente delle entità: paziente, tempo ed informazione. Per ottenere il record di un certo paziente, basta sezionare il file di analisi con un piano parallelo al piano Informazione-tempo. Un piano parallelo al piano paziente-tempo conterrà, invece, la storia temporale di una data informazione, mentre un piano parallelo al piano paziente-informazione conterrà, per ogni paziente, i valori delle informazioni raccolti in uno stesso periodo di tempo.

Per ritrovare nel file di analisi il record di un certo paziente esiste un file (file PATIENT), che contiene per ogni paziente un'abbreviazione assegnatagli dal medico e una chiave numerica assegnatagli dal sistema. I pazienti catalogati in tale file sono ordinati alfabeticamente per permettere una ricerca più efficiente. La chiave numerica è dotata di un puntatore (Fig. 4) relativo ad un blocco di dati (PATIENT DIRECTORY).

Il PATIENT DIRECTORY è costituito da due tabelle. Una tabella contiene i puntatori relativi ai raggruppamenti di informazioni sul paziente in esame ed il numero delle informazioni contenute in ciascun raggruppamento. L'altra tabella, invece, contiene gli indicatori temporali (EVENTS) adoperati per gestire separatamente quelle situazioni fortemente dipendenti dal tempo. Gli EVENTS sono elementi ridondanti in quanto la storia temporale delle informazioni raccolte può essere ottenuta, come abbiamo visto, sezionando il file di analisi con un piano parallelo al piano paziente-tempo. Gli EVENTS vengono, però, mantenuti dal

sistema per aiutare il ricercatore medico nella gestione di quelle informazioni in cui la variabile temporale è di particolare rilievo.

Come il POD, anche il CLINFO è dotato del file SUBSET per la gestione di pazienti con particolari proprietà. Questo file è strutturato in modo che, per ogni paziente che soddisfi particolari richieste, esso contiene un'abbreviazione ed una chiave numerica. Un vantaggio presentato dal CLINFO rispetto al POD è la presenza di una matrice bidimensionale che permette di rappresentare i dati sotto forma di tabelle contenenti relazioni tra qualsiasi gruppo di informazioni. Ciò permette al medico, ad esempio, di eseguire indagini non solo sull'intero file di analisi, ma come spesso è più conveniente su una parte di esso rappresentato in una opportuna matrice.

UN MODELLO RELAZIONALE.

L'esigenza di avere però un data base non limitato nel numero di correlazioni e raggruppamenti ha condotto alla realizzazione di data base relazionali [10, 11]. Data una successione $A_1, A_2, \dots, A_n$ di attributi, una relazione R è rappresentata da una serie di n -righe, ciascuna delle quali contiene il valore associato all'attributo A_1 , poi il valore associato all'attributo A_2 e così via. Una relazione, quindi, può essere rappresentata mediante una tabella. Un esempio di relazione, visita del paziente, è mostrata in Fig. 5a.

Nella rappresentazione tabulare di una relazione devono essere osservate alcune regole: non devono esistere due righe identiche, l'ordine delle righe può essere scambiato, ma quello delle colonne no. Per rendere più rapido l'accesso alle relazioni ciascuna di esse è dotata di una chiave; si definisce chiave una colonna o serie di colonne i cui valori identificano una sola riga della relazione. Nella Fig. 5a la colonna « numero di identificazione » è una chiave per la relazione: visita del paziente, perché non esistono due righe con lo stesso numero di identificazione. Non sempre, però, una colonna in una relazione ne costituisce una chiave: consideriamo ad esempio la relazione: test di laboratorio, in Fig. 5b. Come si vede, in questo caso, il numero di identificazione non è più sufficiente ad individuare una ed una sola riga della relazione. Infatti, un paziente può sostenere analisi di laboratorio in diverse date; comunque, neanche la combinazione delle colonne « numero di identificazione » e « data » costituisce ancora una chiave univoca. Una chiave idonea per questo tipo di relazione è costituita dall'insieme dei tre attributi: numero di identificazione, data, nome del test.

È stato osservato che certe relazioni possono essere gestite più facilmente di altre contenenti gli stessi dati: per questo motivo sono stati realizzati degli algoritmi che trasformano relazioni complesse in altre più elementari, consentendo così di effettuare con maggiore affidabilità e rapidità l'inserzione, cancellazione ed aggiornamento dei dati. Il data base del modello relazionale consiste, quindi, in una collezione di relazioni semplici, ciascuna delle quali è rappresentata in forma tabulare.

Per la gestione dei dati del modello relazionale sono stati realizzati diversi tipi di linguaggi: quello preferito dai medici per la semplicità del suo impiego è il SEQUEL. Questo permette ai medici di formulare le loro

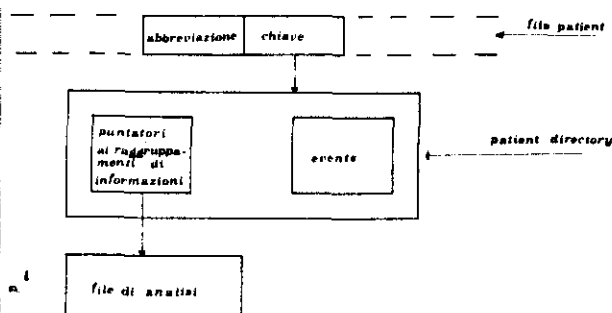


FIG. 4. - Schema di recupero delle informazioni nel data base del progetto CLINFO

A

VISITA DEL PAZIENTE		
num. di id.	data ultima visita	data prossima visita
00001	10/12/80	10/01/81
00002	10/12/80	10/01/81
00003	10/12/80	10/01/81
00004	10/12/80	10/01/81

B

TEST DI LABORATORIO			
num. di id.	data	test	risultato
00001	10/12/80	potassio	3,4
00002	10/12/80	apt	4,2
00003	10/12/80	glucosio	100
00004	10/12/80	glucosio	111

Fig. 5. - Esempi di relazioni in un data base di tipo relazionale

domande senza specificare da quale relazione debbano essere tratte le informazioni richieste. Quindi, l'utente non è tenuto a conoscere la struttura dei dati e le loro relazioni, ma solo la loro presenza nel data base. Questa indipendenza dai dati rende flessibile tale modello permettendo di apportare facilmente dei cambiamenti nella struttura della memorizzazione dei dati senza che l'utente debba preoccuparsi di modificare i suoi programmi applicativi. Questa flessibilità risulta fondamentale in un campo orientato alla ricerca di nuove correlazioni fra malattie, stati clinici, sintomatologie e terapie e tale modello si presenta perciò come la naturale evoluzione dei modelli precedenti, e lungo questa linea il miglior candidato per le future realizzazioni di data base clinici.

PROBLEMI DI SICUREZZA NEL DATA BASE MEDICO.

L'impiego del calcolatore nel trattamento dei dati medici, se da un lato è risultato vantaggioso poiché risolve numerosi problemi clinici e organizzativi dall'altro ha generato un ampio scontento in quanto la riservatezza delle informazioni può venire compromessa. Poiché gli individui e le organizzazioni hanno il diritto di decidere autonomamente quando, come e a chi rendere pubbliche informazioni su di loro, è chiaro che il problema della riservatezza risulta di grande importanza nel campo medico dove le informazioni relative ai pazienti devono essere coperte da segreto professionale e, se conosciute da persone non autorizzate, a volte possono risultare dannose per la vita pubblica del paziente. Il problema si fa tanto più sentire ora in quanto diverse persone quali medici, tecnici, infermieri

ed amministrativi hanno il diritto di accedere ai dati. Per esempio il personale amministrativo, mentre deve poter accedere ai dati riguardanti l'organizzazione burocratica ospedaliera non ha assolutamente il diritto di accedere ai dati personali relativi ai pazienti. Tuttavia, la quantità dei dati in continuo aumento e la necessità di stabilire sempre nuove correlazioni tra i dati stessi ha reso indispensabile il trattamento automatizzato delle informazioni e di conseguenza la realizzazione di metodi per la salvaguardia della riservatezza. Questi metodi sono rivolti al controllo delle operazioni di accesso agli elementi memorizzati, al controllo del flusso delle informazioni da un file ad un altro, al controllo dei questionari ed infine al controllo della codifica di dati confidenziali memorizzati o trasmessi su linee di comunicazione [12-14].

Una prima tecnica per garantire la riservatezza dei dati consiste nel controllare chi, come e quando ha accesso al data base. Questi controlli prevengono non soltanto la distruzione di records o segmenti di programma dovuta alla sovrapposizione di elementi di memoria appartenenti a programmi differenti, ma anche l'accesso ai dati confidenziali.

Per il controllo degli accessi sono state realizzate diverse tecniche quali, ad esempio, assegnare a ciascun utente, che ha il diritto di accedere ai dati, elementi che lo rendono identificabile, evitare che utenti non autorizzati riescano a comprendere informazioni che hanno ottenuto in modo illecito, oppure proteggere le informazioni privilegiate rendendole accessibili solo a particolari programmi.

Un altro metodo di sicurezza consiste nel controllare il flusso dei dati confidenziali. Un tipico flusso da impedire è il seguente: l'utente A ha accesso solo al file X, può conoscere dati confidenziali contenuti nel file Y, al quale ha accesso solo l'utente B, se questi copia le informazioni dal file Y nel file X. La maggior parte dei controlli del flusso impiega il concetto di « classi di sicurezza », cioè i dati vengono divisi in gruppi ai quali sono assegnati dei livelli di sicurezza: le informazioni appartenenti ad una classe con un alto livello di sicurezza non possono essere trasmesse ad una con basso livello di sicurezza.

La riservatezza dei dati può venire inoltre compromessa se, ponendo un'opportuna sequenza di domande permesse, si riescono a dedurre informazioni riservate, correlando le risposte di una serie di domande costruite sulla base di informazioni note a priori. Ad esempio, una possibile inferenza si può ottenere con un dialogo tra utente e data base medico in cui l'utente compone una domanda D che risulta verificata da un solo record e successivamente aggiunge un'ulteriore caratteristica C e formula una nuova domanda « Quante persone soddisfano D e C? », se la risposta è « 1 » vuol dire che C è una caratteristica dell'individuo; se è « 0 », no.

Le difese per la riservatezza di records includono controlli che rifiutano le risposte a domande costituite da un numero sconveniente di informazioni, controlli che deformano le risposte alterando opportunamente i dati ed infine controlli che associano le domande ad una parte ristretta di data base scelta a caso.

Anche la combinazione di questi metodi, spesso, non è sufficiente a garantire la riservatezza del data base, ma poiché ogni risposta contiene informazioni sul data base non è possibile progettare un sistema totalmente sicuro. Per proteggere i dati confidenziali,

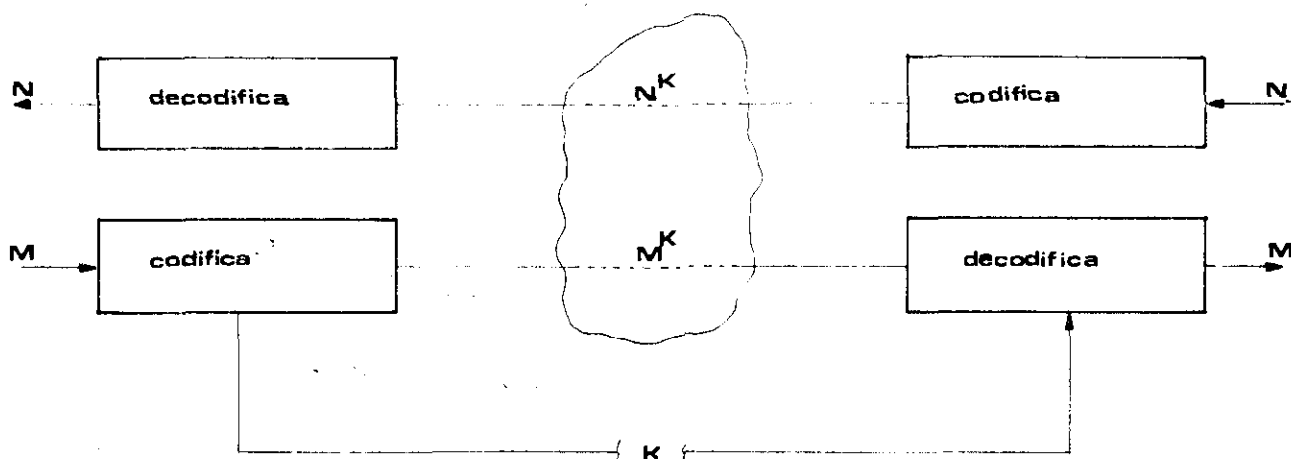


FIG. 6. - Schema semplificato di un sistema crittografico

però, è sufficiente un numero limitato di controlli, perché ciò renda lunghe e costose le operazioni necessarie per compromettere la privacy del data base. Nessuno dei metodi precedentemente presentato è in grado di assicurare la riservatezza dei dati qualora un utente ottenga illecitamente una copia dei dati segreti, oppure riesca ad intercettare dati confidenziali durante la loro trasmissione ad altre unità, per essere elaborate. L'unica tecnica che può garantire la riservatezza, in tal caso, è la codifica: con l'aiuto di una chiave segreta i dati vengono codificati, e solo conoscendo la chiave essi possono essere interpretati. La crittografia (Fig. 6) è una tecnica adottata per proteggere i dati durante la loro trasmissione ed il loro immagazzinamento su supporti fisici. Con l'aiuto di una chiave segreta (K), il testo (M) da trasmettere viene codificato (M^K) e la chiave, usata per codificare il messaggio, viene trasmessa attraverso un canale sicuro; quindi, la riservatezza del messaggio dipende dalla sicurezza del canale e dalla segretezza della chiave. La codifica è imperfetta qualora un intruso riesca a dedurre la chiave analizzando il testo cifrato. Per evitare tale possibilità le chiavi vengono cambiate ad intervalli regolari di tempo, minori di quanto sia necessario ad un intruso per riuscire ad individuare il tipo di codifica.

I quattro tipi di controllo presentati: accesso, flusso, inferenza, codifica, sono specifici di problemi complementari, quindi nessuno di essi non può risolvere quelli degli altri; inoltre, nessun tipo di controllo è perfettamente sicuro. L'impiego combinato delle diverse tecniche, però, può rendere sufficientemente sicuro un data base, riducendo ad un livello accettabile la possi-

bilità che le informazioni confidenziali, in esso contenute, vengano prelevate da utenti non autorizzati.

CONCLUSIONI.

Abbiamo voluto in queste poche pagine introdurre il lettore ad uno dei tanti campi in cui i fisici possono dare un loro importante contributo tecnico alla vita degli ospedali in Italia. Certo questi esempi di data base medici, come abbiamo già detto, non hanno la pretesa di essere rappresentativi della grande quantità dei prototipi realizzati nel mondo, ma vogliono essere un'indicazione degli sforzi che vengono compiuti per uno sfruttamento più completo delle risorse offerte dal trattamento automatico delle informazioni. Essi, comunque, ci permettono a questo punto di fissare alcune caratteristiche irrinunciabili che i data base medici devono avere:

- efficiente raccolta e memorizzazione dei dati nel record medico;
- flessibilità nella risposta a utenti dalle esigenze diverse e nell'esecuzione di ogni necessaria modifica;
- affidabilità e velocità nel recupero dei dati nella forma più utile a ciascun utente;
- non eccessiva richiesta di personale dedicato e, quindi, anche costi contenuti;
- disponibilità di un linguaggio semplice per la memorizzazione e ricerca di dati da parte di utenti non specialisti.

Ricevuto il 2 marzo 1981.

Accettato il 25 giugno 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. O'KANE, C. K. & HALUSKA, E. A. 1977. Perspective in clinical computing. *Adv. Comput.* **16**: 127-182.
2. COLES, E. C., BEILIN, L. J., BULPITT, C. J., DOLLERY, C. D., JAHNSON, B. S., MUNRO-FAURE, A. D. & TURER, S. C. 1975. An approach to computer processing of clinical data. *Comput. J.* **19**: 104-109.
3. WIEDERHOLD, G., FRIES, J. F. & WEYL, S. 1975. Structured organization of clinical data bases, AFIPS Conference Proceed. **44**: 479-485.

4. ADIN, M. 1972. *L'informatique medicale*. Presses Universitaire de France.
5. BEN-BASSAT, M. & LIPNICK, E. 1977. Diagnosis and treatment in MEDAS. MEDINFO 77 Shires Wolf (Ed.). IFIP North Holland Pub. Co., pp. 96-100.
6. ADLASSING, K. P., GERGELY, T., GRABNER, H. & GRABNER, G. 1977. A computer assisted system for diagnostic making on-line usage of the data base of the medical information system WAMIS, MEDINFO 77. Shires Wolf (Ed.). IFIP North Holland Pub. Co., pp. 213-218.
7. ALPEROVITCH, A., FRAGU, P., PATOIS, E. & LELLOUCH, J. 1977. Routine use of a computer aided decision system in hyperthyroidism screening. MEDINFO 77 Shires Wolf (Ed.). IFIP North Holland Pub. Co., pp. 209-212.
8. UEMO, H., SAITO, M. & KAHARA, S. 1977. POD: Patient oriented data base for medical research. MEDINFO 77 Shires Wolf (Ed.). IFIP North Holland Pub. Co., pp. 675-680.
9. SIBLEY, W. L., HOPWOOD, M. D., GRONER, G. F., JOSEPHS, W. H. & PALLEY, N. A. 1977. Data management for clinical research. AFIPS Conference Proceed. 46: 63-68.
10. CHAMBERLAIN, D. D. 1976. Relational data base management system. Computing Survey. 8: 43-66.
11. YASNHOFF, W. A. & CARLSON, R. 1977. Relational data base for ambulatory care. MEDINFO 77 Shires Wolf (Ed.). IFIP North Holland Pub. Co., pp. 481-485.
12. DENNING, D. E. & DENNING, P. J. 1979. Data security. ACM Computing Surveyes. 11: 227-249.
13. DOBKIN, D., JONES, A. K. & LIPTON, R. J. 1979. Secure data base: protection against user influence. ACM Computing Surveyes. 14: 97-106.
14. GRIESSER, G. 1977. Technical aspects of data protection in health information system. MEDINFO 77 Shires Wolf (Ed.). IFIP North Holland Pub. Co., pp. 723-728.

Dosimetria clinica a termoluminescenza

CLAUDIO FURETTA

I Cattedra di Fisica Medica, Servizio di Fisica Sanitaria, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - *Da alcuni anni la dosimetria a termoluminescenza si è assicurata un posto di primaria importanza tra le tecniche di rivelazione delle radiazioni ionizzanti. Nell'ambito della dosimetria personale l'uso dei dosimetri a termoluminescenza si è talmente esteso da soppiantare o quasi, in molti Paesi, quella fotografica. L'uso principale, a parere dell'Autore, è però da ricercarsi nelle applicazioni mediche, dove ha fornito uno strumento di misura realmente unico. Al fine di dare utili indicazioni sulla situazione attuale, si passano in rassegna le molteplici applicazioni della dosimetria a termoluminescenza nel settore medico, fornendo inizialmente alcune nozioni di carattere generale sul fenomeno TL e sulle caratteristiche dei dosimetri.*

Summary (Thermoluminescence Clinical Dosimetry). - *Thermoluminescence (TL) dosimetric systems are of primary value as ionizing radiation detectors, particularly in the field of individual dosimetry, and they often substitute film-dosimetry. However, according to the Author, the most important applications of TL dosimetry are to be found in medicine. Some general information about the physical mechanism of thermoluminescence is given; various applications of TL dosimetry in medicine are reviewed.*

INTRODUZIONE.

Storicamente, la prima osservazione del fenomeno termoluminescente è attribuibile a Robert Boyle nel 1663. Solo durante gli ultimi venti anni, però, il fenomeno è stato studiato in modo esteso e capillare ed il numero delle pubblicazioni attuali su tale argomento si aggira sulle 3.000 unità, con un incremento di più di 300 lavori annuali, senza contare i congressi internazionali che si svolgono ormai regolarmente a partire dal 1965.

Il fenomeno della termoluminescenza consiste nell'emissione di luce da parte di un materiale cristallino stimolato termicamente; la luce emessa è proporzionale alla dose di radiazione ionizzante ricevuta precedentemente dal materiale. Una volta prodotta la luce, l'informazione relativa alla radiazione ionizzante è cancellata, poiché il ciclo termico a cui è sottoposto il materiale è di tipo distruttivo. Negli ultimi anni, sono state però introdotte tecniche che permettono di compiere successive riletture del materiale irraggiato [1].

MECCANISMO.

L'interpretazione qualitativa e quantitativa dei dati sperimentali ottenuti su cristalli TL procede sulla base di quello che, definito come il meccanismo fondamentale della termoluminescenza, è descritto in termini di modello a bande per il reticolo cristallino in questione.

Inizialmente, nei materiali TL con cui si ha a che fare, la banda di conduzione è vuota, e così anche i centri intrappolatori dovuti ad imperfezioni reticolari di vario tipo e presenti nella gap proibita, mentre la banda di valenza è piena, popolata da un numero di elettroni che è legato al numero dei livelli energetici di partenza.

Il campione in esame viene quindi sottoposto ad una eccitazione esterna, che può essere di varia natura, il cui effetto è di trasmettere energia agli elettroni situati nella banda di valenza (B.V.); per effetto di tale cessione di energia, tali elettroni vengono innalzati alla banda di conduzione (B.C.), compiendo un salto energetico che ammonta ad alcuni elettronvolt; essi, pertanto, lasciano alcuni posti vuoti in B.V., che sono del tutto assimilabili a portatori di carica di segno opposto rispetto agli elettroni, e vengono chiamati lacune.

Gli elettroni arrivati in B.C., tendono a ricadere in stati energetici inferiori e vengono pertanto intrappolati nei centri posti nella gap proibita; analogamente le lacune vengono intrappolate in altri centri posti in vicinanza della B.V.: quindi, quello che macroscopicamente si manifesta come un immagazzinamento di energia da parte del cristallo termoluminescente, si può schematizzare in termini di una popolazione di elettroni e di lacune che, abbandonate le rispettive sedi, vengono catturate e congelate nei rispettivi centri, metastabili in quanto situati nella gap proibita.

Per avere una informazione sull'entità della carica totale intrappolata, come pure sull'ubicazione dei diversi centri e sulle diverse probabilità che caratterizzano statisticamente le transizioni possibili, occorre rimettere in circolo tali cariche: ciò viene realizzato mediante una eccitazione secondaria che, per la termoluminescenza, è data dal riscaldamento del campione in esame.

Riscaldando il materiale, le cariche immagazzinate vengono liberate secondo vari meccanismi che possono essere sostanzialmente ricondotti alla ricombinazione di un elettrone con una lacuna e conseguente emissione di radiazione luminosa (luce TL) che è la grandezza che si può misurare con un opportuno apparato sperimentale.

La determinazione completa delle proprietà di un livello di trappole richiede la conoscenza di due parametri, entrambi ricavabili sperimentalmente, vale a dire l'energia di attivazione, che è l'energia da fornire per permettere ai portatori di carica presenti di operare la transizione verso la banda adiacente, e il cosiddetto fattore di frequenza che esprime quantitativamente la attitudine dei portatori presenti nel centro ad abbandonarlo: schematizzando il livello di trappole come una buca di potenziale, il fattore di frequenza risulta legato alla frequenza vibrazionale del cristallo e, quantisticamente, al coefficiente di riflessione attraverso le pareti della buca. Inoltre, bisogna assumere un tipo di statistica che regoli completamente la cinetica dei portatori di carica all'interno del cristallo: tale statistica è quella di Boltzmann che definisce pertanto la frequenza di transizione a partire dal fattore di frequenza e dal salto energetico da compiere.

La ricombinazione elettrone-lacuna può avvenire in modi diversi. Infatti quando il campione viene riscaldato, si potrebbe verificare uno dei seguenti processi:

- innalzamento di elettroni in B.C., successiva caduta di questi nei centri per lacune e ricombinazione radiativa;
- innalzamento di elettroni in uno stato eccitato, ricaduta nei centri per lacune e ricombinazione radiativa;
- innalzamento di lacune in B.V., ricaduta nei centri per elettroni e ricombinazione radiativa;
- innalzamento simultaneo di elettroni in B.C. e di lacune in B.V.; successiva ricaduta di entrambi i portatori nei centri di luminescenza ove avviene la ricombinazione radiativa.

Le esperienze di interesse dosimetrico risultano quelle in cui i centri siano sufficientemente profondi da rendere minima la probabilità che si verifichi uno dei suddetti processi per temperature dell'ordine di grandezza della temperatura ambiente. Qualora questa condizione non sia soddisfatta, si va incontro ad un fenomeno che va sotto il nome di fosforescenza, ed è caratterizzato da un rapido spegnimento dell'emissione di luce.

La determinazione dei parametri che caratterizzano i centri in questione avviene tramite lo studio dell'intensità della luce emessa, I , in funzione della temperatura cui è sottoposto il dosimetro a termoluminescenza (TLD): la curva che si ottiene, della *glow-curve*, ha una forma a campana; nell'ipotesi, realistica, dell'esistenza di più livelli di trappole, a differenti profondità in energia rispetto alla B.C. nella *glow-curve* si osserva un picco per ogni livello considerato, e la curva totale risulta data dalla sovrapposizione di più curve, ognuna corrispondente ad un livello. Dall'osservazione della *glow-curve* si possono in definitiva trarre informazioni sulla struttura dei centri presenti nella gap proibita, sulle popolazioni di portatori carichi in essi presenti, sulle diverse modalità e probabilità di transizione tra due stati a differente energia.

Inoltre, dall'area sottesa dalla *glow-curve* si può ricavare l'entità dell'emissione totale TL, cioè valutare se e come il trattamento subito dal campione influisca sulla risposta da esso fornito, cioè sulla sua sensibilità. Da un punto di vista dosimetrico, l'area di cui sopra è proporzionale alla dose ricevuta dal materiale.

Dalla sola analisi qualitativa della *glow-curve* si possono trarre informazioni generali sul comporta-

mento del materiale TL in questione: se la *glow-curve*, ad esempio, presenta solo picchi a bassa temperatura, significa che i livelli di trappole considerati presentano energie di attivazione molto basse (trappole superficiali), il che determina una certa perdita dell'emissione di luce da studiare, in conseguenza di una probabilità non trascurabile di innalzamento degli elettroni in B.C. anche a temperatura ambiente: un tale materiale TL non sarà perciò indicato per misure che richiedano un immagazzinamento del segnale per tempi lunghi. Se di altro canto la *glow-curve* presenta picchi a temperatura elevata, l'emissione TL risulterà mascherata da una forte emissione infrarossa, cosa che crea problemi tecnici di rivelazione e discriminazione del segnale TL che interessa.

Una *glow-curve* con picchi non ben definiti renderà difficoltose quelle misure ove si richieda una valutazione della luce globalmente emessa, data dall'integrale della *glow-curve*: il motivo di ciò va individuato nella non agevole scelta dei limiti di integrazione, e facilmente si potrà incorrere in errori sistematici a ciò riconducibili.

Un altro problema, comune a ogni *glow-curve*, è la sensibile dipendenza della posizione apparente dei picchi dal particolare valore della velocità di salita della temperatura (*heating rate*), regolabile a piacere entro un intervallo di valori tipico dell'apparato strumentale usato.

Da un punto di vista pratico, quindi, la forma ideale per una *glow-curve* è quella in cui essa presenta un picco singolo, ben risolto, a temperatura né troppo bassa, così da assicurare una buona stabilità del segnale a temperatura ambiente, né troppo alta, in modo da non dar luogo ai detti problemi tecnici. Un valore ottimale risulterebbe attorno ai 200° C.

TEORIA.

L'emissione luminosa ad opera di materiali termoluminescenti può essere descritta facendo ricorso al modello teorico di Randall e Wilkins [2], e ad altri che di questo costituiscono una generalizzazione [3-5]. Come già accennato nel precedente paragrafo, il punto di partenza è costituito dal modello a bande dei solidi cristallini e dalla teoria dei centri di colore dalla quale risulta evidente la possibilità di schematizzare irregolarità localmente presenti nel reticolo, e dovute a difetti di vario tipo, come livelli di trappole posti tra la B.V. e la B.C., a profondità caratteristiche al disotto di quest'ultima.

Considerando un singolo livello di trappole per elettroni, a profondità E sotto la B.C., e chiamando s' il relativo fattore di frequenza, si può notare come, secondo la statistica di Boltzmann, la probabilità di innalzamento in B.C. sia esponenzialmente legata al dislivello energetico da superare, secondo la relazione:

$$(1) \quad \gamma = s' \exp \left(- \frac{E}{kT} \right)$$

Tenendo conto della (1) si può esprimere l'evoluzione della popolazione n presente nel livello considerato mediante la relazione fondamentale di Randall e Wilkins:

$$(2) \quad \frac{dn}{dt} = - \gamma n$$

nella quale si considera trascurabile la probabilità che un elettrone, già innalzato in B.C., possa ricadere (ovvero essere reintrappolato) nel livello di partenza. La (2) può essere direttamente integrata e dare l'espressione cercata per n :

$$(3) \quad n = n_0 \exp \left\{ - \frac{s'}{\beta} \int_{T_0}^T \exp \left(- \frac{E}{kT} \right) dT \right\}$$

ove T è la temperatura espressa in $^{\circ}\text{K}$ e β il rateo termico.

La (3) può anche essere utilizzata per ricavare, mediante la relazione differenziale:

$$(4) \quad I = -c \frac{dn}{dt}$$

l'espressione esplicita per l'intensità luminosa emessa:

$$(5) \quad I = c s' n_0 \exp \left(- \frac{E}{kT} \right) \cdot \exp \left\{ - \frac{s'}{\beta} \int_{T_0}^T \exp \left(- \frac{E}{kT} \right) dT \right\}.$$

Esaminando quindi l'andamento di I in funzione della temperatura T si osserva come, inizialmente, risulti prevalente il termine statistico di Boltzmann, crescite con T . Ciò si può fisicamente interpretare che, per bassi valori di T , un suo aumento comporti prevalentemente un'accresciuta probabilità di liberazione di elettroni dalle trappole, legata ad una maggior eccitazione termica. Successivamente, comincia ad acquistare importanza la diminuzione del numero di elettroni ancora intrappolati, finché, per alte temperature, questo ultimo fenomeno risulta prevalente e la emissione luminosa tende ad estinguersi. In presenza di tali fenomeni competitivi ci si deve quindi aspettare, come si riscontra sperimentalmente, un iniziale aumento, con T , dell'emissione luminosa, il successivo raggiungimento di un valore di massimo, seguito da un suo progressivo spegnimento. È quindi spiegabile, alla luce del presente modello, la forma a picco per la $I(T)$.

Un secondo tipo di generalizzazione del modello di Randall e Wilkins può essere compiuto se si assume la possibilità che un elettrone liberato ed innalzato in B.C. venga reintrappolato nel livello di partenza (3). La relazione fondamentale (2), non risulta allora più valida, mentre continua ad esserlo la (4), ed in sua vece occorre scrivere una relazione più generale del tipo:

$$(6) \quad \frac{dn}{dt} = -\gamma n^l$$

nella quale figura un ulteriore parametro l . Esso è chiamato ordine della cinetica in quanto strettamente legato alla qualità dei processi che hanno luogo durante il riscaldamento. Nel caso in cui sia assente il reintrappolamento si ha $l = 1$ e si ritorna alle espressioni precedentemente citate; se invece il reintrappolamento è dominante, l risulta essere uguale a 2. Un valore di l compreso tra tali situazioni limite indica che ambedue i processi sono presenti ed il peso con cui ciascuno dei due interviene nella cinetica globale lo definisce numericamente. L'osservazione sperimentale di situazioni in cui $l < 1$, ha portato ad ipotizzare l'esistenza di un contributo di ordine 0 dovuto a processi non radiativi.

L'integrazione della (6) porta ad espressioni analoghe, se pure più complesse, alle (3) e (5).

MATERIALI TL.

I materiali che esibiscono il fenomeno TL sono molti e vanno dai cristalli inorganici ai composti organici. Si deve inoltre considerare che è quasi impossibile predire le caratteristiche TL di un materiale dalle sue sole caratteristiche chimico-fisiche.

I materiali più studiati per il loro comportamento TL sono quelli usati nelle applicazioni di dosimetria delle radiazioni ionizzanti: CaF_2 , LiF , CaSO_4 , Mg_2SiO_4 , $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$, BeO ; a tali sostanze di base se ne aggiungono altre, tali da aumentare l'efficienza termoluminescente. Molti, dei citati materiali, possono facilmente essere preparati in laboratorio.

VANTAGGI E SVANTAGGI DEI DOSIMETRI TL.

a) I TLD sono sensori generalmente molto piccoli, le cui dimensioni possono variare a seconda del tipo di materiale usato. Valori tipici sono i seguenti:

$(3,2 \times 3,2 \times 0,9) \text{ mm}^3$	ribbons
$(1 \times 1 \times 6) \text{ mm}^3$	rods.

Possono essere realizzati anche sotto forma di polveri, per quanto in tale stato siano di scomoda manipolazione.

I TLD non sono solubili in acqua e possono essere disinfettati e subire, senza danno, i normali metodi di sterilizzazione.

L'informazione relativa alla dose ricevuta è mantenuta dal dosimetro per lunghi periodi di tempo.

La loro risposta alla radiazione ionizzante è generalmente indipendente dal rateo di dose ed inoltre manifestano un ampio campo di sensibilità, che va dal microrad o millirad, a seconda del materiale, al kilorad.

In molti casi la risposta è dipendente dall'energia della radiazione ionizzante e quindi, un particolare sistema dosimetrico può essere usato per la determinazione dell'energia di un campo di radiazioni non noto.

b) Per ciò che riguarda gli svantaggi, invece, la dipendenza energetica può rappresentare una fonte di grossolani errori se non si apportano le necessarie correzioni alla risposta TL.

È impossibile stabilire, almeno attualmente, se un determinato irraggiamento sia stato effettuato durante un tempo più o meno lungo.

Altro fattore negativo è la perdita di informazione dosimetrica a causa di fattori ambientali di cui non si tenga il dovuto conto.

A conclusione di questo breve paragrafo, pur non volendo entrare in particolari e limitandosi al solo uso in medicina, argomento di questa rassegna, si vuole evidenziare che nessun altro sistema dosimetrico è così versatile e di facile impiego quanto quello costituito dai dosimetri a termoluminescenza. Può essere fatta una eccezione a favore di particolari camere a ionizzazione miniaturizzate, che permettono anche misure intracavitari ma che risultano essere costosissime e di estrema delicatezza.

USO CLINICO.

Si sa come le radiazioni ionizzanti siano ormai largamente usate nel campo medico, sia in diagnostica che in terapia, come nella ricerca biomedica, ed è altrettanto noto che l'esposizione ad esse, se non opportunamente controllata, può essere causa di effetti biologici dannosi. Per una appropriata valutazione del rapporto rischio/beneficio nell'uso di tali radiazioni, è essenziale una quantificazione della dose assorbita dal paziente.

Vari fattori entrano in gioco nella selezione di un dosimetro che possieda determinate caratteristiche tali da renderlo appropriato per le applicazioni mediche. Tra questi fattori si possono citare:

- accuratezza nella stima della dose;
- una risposta che sia simile a quella del tessuto biologico;
- possibilità di risolvere le dosi ricevute da organi contigui.

I sistemi dosimetrici a termoluminescenza rispondono in modo del tutto soddisfacente alle dette caratteristiche.

Tra i materiali già citati, quelli che meglio si prestano alle applicazioni mediche, e che sono in uso ormai in molti Enti ospedalieri italiani e stranieri, sono il LiF , il $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ e l' BeO .

Questi materiali presentano quelle caratteristiche di precisione, sensibilità, riproducibilità, trasparenza alla radiazione, opportune dimensioni e tessuto equivalenza come richiesto ad un sistema dosimetrico idoneo ad applicazioni cliniche.

In terapia, i TLD trovano una vasta gamma d'impiego. Si possono citare come esempi:

- il monitoraggio dell'uscita delle apparecchiature terapeutiche;
- la valutazione dell'uniformità dei fasci;
- la misura della dose assorbita, sia in fantoccio che *in vivo*.

A tale proposito, l'avvento dei dosimetri a termoluminescenza e la realizzazione di fantocci tessuto equivalenti, permettono di valutare tecnicamente la validità della dose calcolata nel volume d'interesse: da ciò segue che è così possibile valutare la bontà del trattamento ed i possibili errori di calcolo.

I dosimetri TL hanno un'alta precisione, una rapida acquisizione dell'informazione dosimetrica, una buona stabilità ambientale, una buona equivalenza al tessuto biologico, un ampio range di sensibilità. Questa ultima proprietà è molto importante specialmente per la determinazione della dose assorbita dai tessuti circostanti un sito tumorale e che non sono pertanto direttamente interessati all'azione terapeutica del fascio.

Un ulteriore vantaggio dei TLD è rappresentato dalle loro piccole dimensioni: ciò permette di determinare il gradiente di dose in quelle tecniche radioterapiche ove ciò sia richiesto, come la possibilità di effettuare misure intracavitarie.

Con pieno successo i TLD sono usati per la determinazione della dose-gonadi e della dose-pelle di pazienti sottoposti ad esami radiografici. Tale uso è invece di routine, specialmente all'estero.

Da quanto precedentemente detto risulta evidente che l'utilizzazione dei dosimetri a termoluminescenza può permettere:

- di migliorare la progettazione di apparecchiature radiogene al fine di ridurre la dose assorbita dal paziente;
- di migliorare le tecniche radiografiche al fine, sempre, di ridurre la dose assorbita;
- di gettare le basi di una reale analisi epidemiologica della dose assorbita dalla popolazione a causa di esami radiologici.

Pur tuttavia, sebbene la dosimetria a termoluminescenza stia dimostrando la sua grande utilità sia in medicina che in biologia, essa non è ancora largamente usata come dovrebbe. Ciò è sorprendente, se si considera l'alta precisione e la grande semplicità d'uso dei lettori commerciali TLD e la vasta gamma di dosimetri che li rendono idonei alla dosimetria clinica e biologica.

In ogni caso, molti centri di fisica medica e sanitaria hanno stabilito procedure ben precise per le tecniche di rilevazioni dosimetriche effettuate tramite TLD, il che sta a dimostrare chiaramente l'enorme potenziale della dosimetria a termoluminescenza, particolarmente per le misure *in vivo*: ci si può dunque aspettare con certezza una positiva evoluzione nell'uso di questa tecnica.

Prima di passare in rassegna i singoli lavori di dosimetria clinica che vengono effettuati tramite dosimetri a termoluminescenza, è interessante riportare alcuni dati presentati da N. Suntharalingam [6] sull'uso dei dosimetri a termoluminescenza, nel settore clinico, riferentesi agli Stati Uniti. I risultati di questa analisi statistica sono riportati nelle seguenti tabelle.

Dalla Tab. 1 risulta che in terapia i TLD sono usati al 95 %; nella tabella sono pure riportate le percentuali parziali per le varie applicazioni.

Tabella 1. - Percentuale d'utilizzazione in terapia.

TERAPIA (95%)	Percentuale
Dose pelle	80
Dose ingresso/uscita	67
Testa e collo	58
Esofago	35
Retto	31
Cervice	20
Vescica	14
Impiantazione interstiziale	14

La Tab. 2 riporta invece le percentuali parziali per l'uso in diagnostica.

Per quanto riguarda i tipi di fosfori usati, la successiva Tab. 3 ne riporta le percentuali.

L'analisi riporta pure alcuni dati sulla precisione raggiunta durante le misure dosimetriche (Tab. 4).

Tabella 2. - Percentuale d'utilizzazione in diagnostica.

DIAGNOSTICA (50%)	Percentuale
CT scanning	75
Mammografia	48
Studi speciali	46
Cateterismo cardiaco	37
Fluoroscopia	37
Pediatria	25

Tabella 3. - Percentuali d'uso dei materiali TL e dei tipi.

MATERIALI TL	Percentuale
LiF (TLD-100)	83
LiF (Throwaway)	26
LiF (TLD-700)	11
CaF ₂ :Mn	8
Li ₂ B ₄ O ₇ :Mn	3
Tipi:	
Ribbons e chips	79
Rods	32
Capsule Throwaway	15
Dischi di teflon	8

Tabella 4. - Percentuali delle precisioni raggiunte durante misure dosimetriche.

UTILIZZATORI (%)	Precisione (%)
60	5
24	2
16	10

APPLICAZIONI CLINICHE.

Presso il Dipartimento di Radiologia dell'Ospedale Thomas Jefferson di Filadelfia, la dosimetria a termoluminescenza è comunemente usata per la valutazione della dose al paziente (7-10). Il fosforo prescelto è il LiF, sia in forma solida che in polvere. Il LiF solido, in rods, è inserito in comuni cateteri per la dosimetria *in vivo*.

I settori di applicazione dei TLD, presso il detto Dipartimento, sono i seguenti:

- comparazione della dose calcolata con quella misurata al fine di verificare la bontà del metodo di calcolo (in fantoccio);

- misura della dose in punti particolari del volume irradiato allo scopo di risolvere problemi relativi alla stima della dose al di fuori del piano di trattamento (in fantoccio);

- misura dell'andamento della dose in profondità, in funzione dell'angolo di incidenza del fascio e delle dimensioni del campo.

Anche queste misure vengono fatte in fantoccio e per sorgenti ⁶⁰Co, betatrone ed X di elevata energia;

- misura della dose superficiale nella terapia eseguita con ⁶⁰Co e con betatrone (misure *in vivo*);

- studio della forma dei campi con la tecnica del mantello (in fantoccio);

- misura della dose ricevuta dal paziente durante esami diagnostici;

- misura *in vivo* della dose d'ingresso e d'uscita durante l'uso di campi opposti paralleli e nel trattamento iperbarico;

- misura della dose nella terapia del tumore all'esofago, della vescica e della cervice.

Questi studi hanno permesso di mettere a punto migliori tecniche di irraggiamento, come nel caso del trattamento del seno, del torace, della testa e del collo.

Al Radiumhemmet di Stoccolma, B.J. Rudén [11] ha condotto una serie di accurate misure usando il LiF. Sin dal 1932, il monitoraggio della radiazione della dose al paziente veniva effettuato con piccole camere a ionizzazione, di alto costo e di difficile manipolazione. A partire dal 1968 vennero introdotti i dosimetri a termoluminescenza, effettuando con essi circa il 67 % delle misure cliniche. Nel 1974 tale percentuale raggiunge il 98 %.

Tra le misure effettuate da Rudén si possono citare:

- ⁶⁰Co ed X d'alta energia: in tal caso i dosimetri, contenuti in opportuni contenitori di perspex per il raggiungimento dell'equilibrio elettronico, sono attaccati alla superficie del corpo per la determinazione della dose d'ingresso.

- Elettroni d'alta energia: l'uso dei dosimetri non è limitato al solo controllo della dose prescritta, ma anche per la determinazione della dose di ingresso.

- Elettroni d'alta energia: l'uso dei dosimetri non è limitato al solo controllo della dose prescritta, ma anche per la determinazione della dose entrante in differenti punti quando l'irradiazione è fatta con fasci larghi irregolari su superfici ove lo stesso contorno del corpo può essere irregolare.

- Determinazione della dose assorbita da organi che si trovano al di fuori del fascio primario, quali occhi e gonadi.

- La misura della dose in uscita viene compiuta per apportare le opportune correzioni al valore della dose assorbita a causa della diversa densità di organi interni attraversati dal fascio. Il metodo della dose in uscita è pure applicato per calcolare la dose assorbita da una zona tumorale durante l'irradiazione. Nel trattamento del carcinoma dell'esofago, ad esempio, questa tecnica è usata per misurare la variazione della dose lungo l'esofago.

— Per misure intracavitarie i dosimetri sono inseriti in cateteri di teflon sterilizzati. Separatori di piombo, posti tra un dosimetro e l'altro, permettono di stabilirne l'esatta posizione in scopia. Una tecnica analoga è seguita per l'esofago, specialmente quando si richiede l'irradiazione con tre fasci.

L'accuratezza, la stabilità e la riproducibilità del sistema TLD è garantita dai seguenti dati, che riguardano un anno di misure e si riferiscono alla media delle differenze tra dose assorbita e dose prescritta (Tab. 5).

La seguente Tab. 6 si riferisce invece al periodo di un mese (dose di ingresso).

Un sistema TLD basato sul $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$: Mn in polvere è attuato dal National Radiological Protection Board di Harwell [12-13]. Tale Ente ha interessato vari ospedali su tutto il territorio inglese, instaurando un intenso lavoro sia di ricerca sia di routine.

Le ragioni che hanno guidato alla scelta di questo particolare sistema dosimetrico sono derivate dal fatto che il borato di litio attivato con manganese, ha un assorbimento caratteristico dei raggi X quasi simile a quello del tessuto biologico. La sua equivalenza è fortemente influenzata dalla percentuale in peso di manganese e calibrando la proporzione, si può raggiungere una stretta equivalenza con il tessuto. La glow-curve inoltre è costituita da due soli picchi, dei quali il primo ha un fading molto rapido e la procedura di annealing è semplice: sono sufficienti per l'azzerramento del fosforo 300 °C per 30 min.

Nell'uso di routine la sensibilità del borato di litio in polvere è calibrata periodicamente con raggi del Cs-137, tenendo conto della diversità tra radiazione di calibrazione e radiazione da misurare tramite un fattore

Tabella 5. — Medie percentuali delle differenze tra dose assorbita e dose prescritta. Periodo di osservazione: un anno.

UNITÀ DI TRATTAMENTO	Media (%)
Acceleratore lineare da 6 MeV (417 misure, con i di filtraggio nel fascio)	+ 0,4
Acceleratore lineare da 6 MeV (619 misure, fascio aperto)	+ 0,6
Acceleratore lineare da 6 MeV (128 misure, fascio irregolare con blocchi di piombo nel fascio)	+ 4,4

Tabella 6. — Medie percentuali delle differenze tra dose assorbita e dose prescritta. Periodo di osservazione: un mese.

UNITÀ DI TRATTAMENTO	Media (%)
Cobalto	— 1,5
Acceleratore lineare	+ 0,6
Betatrone (x)	— 2,6
Betatrone (elettroni)	+ 1,9

di correzione. I dati ottenuti sono stati paragonati anche a quelli di una camera a ionizzazione cilindrica da 35 ml. I sacchetti di plastica, aventi uno spessore di 0,12 mm, contenenti 30 mg di borato di litio, e la camera, sono calibrati con un dosimetro standard secondario Baldwin Farmer, usando uno stretto fascio di γ provenienti da una unità terapeutica al Co-60. L'equilibrio elettronico è stabilito per entrambi i tipi di rivelatori, circondandoli con un adeguato spessore di perspex. I 30 mg di borato di litio sono risultati sufficienti per misurare dosi di 0,1 mGy (10 mrad), nella zona della radiazione X da 15 e 100 keV. La deviazione standard, espressa come per cento della media della lettura di cinque dosimetri, fornisce la precisione del sistema ed è del 6,5 % su dosi di 0,1 mGy (10 mrad), per scendere a 1,1 % su dosi di 5 Gy (500 rad). Le dosi al paziente sono misurate durante vari tipi di esami a raggi X, quali il cateterismo cardiaco, l'angiocardigrafia, e la meningografia. I danni da radiazione al midollo osseo sono quasi sempre i maggiori meccanismi che operano nella morte da radiazione e nelle malattie acute da esse provocate, perché esso ha dei livelli ammissibili di dose tra i più bassi di tutto il corpo. La forma della curva della dose al midollo osseo in funzione dell'energia dei fotoni, in un fantoccio esposto ad un campo di radiazioni X rotazionale, presenta delle diversità a seconda del metodo con cui viene ricavata.

I metodi generalmente noti sono quelli di Wilson e Carruthers che hanno usato dei dosimetri chimici, e quello di Jones che ha condotto gli studi utilizzando dosimetri a termoluminescenza al LiF. Robert A. Facey del Defence Chemical, Biological and Radiation Laboratories di Ottawa, Canada [14], ha ricavato nuovamente questa curva confermandone la forma generale, investigando in particolare su quei problemi considerati causa dei risultati ottenuti dagli altri Autori. Uno di questi problemi deriva dalla degradazione in energia entro il fantoccio, e tale da spostare la risposta del sistema dosimetrico. Egli analizzò questo problema con curve profondità/energia ottenute con un sistema a termoluminescenza LiF + CaSO_4 :Sm. Il LiF venne utilizzato per la misura della dose locale, mentre il CaSO_4 per stimare l'energia. Le curve profondità/energia mostrano due meccanismi: un alleggerimento della radiazione incidente nel tessuto molle e un indurimento nel midollo. I dati ottenuti da Facey, considerando le influenze dei detti fattori, forniscono una spiegazione qualitativa della forma delle curve di profondità/energia e di quella di dose al midollo.

Presso il Meath Hospital di Dublino, dosimetri al LiF ed al CaSO_4 :Dy sono stati usati per determinare la vita media dello iodio nella tiroide dell'uomo [15]. I risultati di tali misure hanno permesso di stabilire che il sistema TLD è sufficientemente sensibile a quantità di ^{131}I o ^{125}I minori di 18,5 kBq (0,5 μCi).

In Austria, dalla collaborazione tra il Prunfstalt für Radiologie e la Med. Univ. Klinik, di Vienna, si è avuto un interessante studio sugli effetti della radiazione gamma sul feto umano. L'uso di rivelatori TLS al LiF, ha permesso la stima della dose ricevuta da una donna incinta affetta da carcinoma alla cervice e trattata con ^{226}Ra [16].

Il Northeast Center for Radiological Physics del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center di New York, in collaborazione con altri centri, ha compiuto un ac-

curato studio sulla determinazione della dose ricevuta dal paziente durante esami mammografici. L'esposizione in funzione della profondità fu misurata tramite dosimetri al LiF inseriti in fantocci tessuto equivalenti [17]. Sotto gli auspici della Commissione per l'Energia Atomica Turca, ed utilizzando dosimetri al LiF, è stato compiuto un ampio studio al fine di determinare la dose gonadi in 14 tipi di esami radiologici. L'analisi fu fatta in tre ospedali di Ankara [18]. Un interessante confronto tra dose misurata tramite dosimetri TLD e dose calcolata, è stato fatto da alcuni ricercatori del Centro di Medicina Nucleare di Lione. Tale confronto è stato compiuto su pazienti volontari durante trattamento con ^{131}I [19]. Dosimetri al LiF vennero posti all'interno dell'utero prima della somministrazione dello iodio e rimossi 2 mesi più tardi. Le misure effettuate in tal modo hanno permesso un confronto con la dose calcolata tramite il metodo di Robertson e Gorman. I risultati ottenuti sono risultati essere in buon accordo con quelli calcolati. Dosimetri al LiF sono stati utilizzati durante il trattamento della leucemia tramite Total Body Irradiation. La tecnica, messa a punto presso l'Institute of Cancer Research di Sutton, in collaborazione con il Royal Marsden Hospital, Sutton, comporta un trattamento frazionato di 8,5-10 Gy (850-1000 rad) per volta. I dosimetri impiegati consistono in polvere di LiF contenuta in capsule. L'uso dei TLDs ha permesso di compiere una accurata verifica del calcolo teorico [20]. Anche nella tecnica 90° Compton Scattering Tomography sono stati usati dosimetri al LiF [21]. Questa tecnica consiste in un metodo tridimensionale non computerizzato che permette la tomografia frontale e sagittale del polmone, e non implica il movimento della sorgente né del rivelatore. Le valutazioni dosimetriche sono state ottenute usando il tronco di un fantoccio Alderson e dosimetri TLD-100 (LiF). I dosimetri vennero collocati in appositi fori praticati all'interno del fantoccio, permettendo una accurata rilevazione della dose pelle, della dose massima ricevuta dai polmoni e della dose gonadi.

Una interessante applicazione *in vivo*, anche se solo su cavie, è stata compiuta dal Department of Radiological Sciences, Università di Oklahoma [22]. La determinazione della dose X e gamma, rilasciata ai polmoni di cavie dopo iniezione di ^{99}Tcm , fu determinata tramite dosimetro al LiF incapsulato in vetro. Le dimensioni dei dosimetri sono sufficientemente piccole da consentire il loro passaggio attraverso il cuore delle cavie e per fermarsi quindi nelle piccole arterie. I cani venivano uccisi un giorno dopo l'iniezione del tracciante, al fine di recuperare i dosimetri per la lettura. La dose media misurata (dose X e gamma) ai polmoni, su 11 cavie, risultò essere di $(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-6} \text{ mGy MBq}^{-1}$ ($189 \pm 16 \text{ mrad mCi}^{-1}$). Tale valore fu corretto sottraendovi i contributi di dose ai polmoni dovuti al fegato ed alla milza, ottenendo una dose media di $(4,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-6} \text{ mGy MBq}^{-1}$ ($152 \pm 27 \text{ mrad mCi}^{-1}$), in buon accordo con il valore calcolato di $3,4 \cdot 10^{-6} \text{ mGy MBq}^{-1}$ ($126 \text{ mrad mCi}^{-1}$).

Presso l'Istituto di Medicina Nucleare e Scienze Affini di Delhi, India, in collaborazione con il Dipartimento di Fisica ed Astronomia dell'Università della stessa città, è stato compiuto un interessante studio di rilevazioni dosimetriche associato all'uso di unità radiografiche, montate su camioncini [23]. In questo studio fu usato come TLD il $\text{CaSO}_4 \cdot \text{Dy}$, in polvere, rea-

lizzato presso il Babha Atomic Research Centre di Bombay. 50 mg di fosforo furono inglobati in capsule di gelatina, che vennero applicate sul paziente in posizione centro-fascio di ingresso ed in uscita e vicino alle gonadi. Per il monitoraggio dei livelli di radiazione all'interno del mezzo mobile, alcune capsule furono applicate agli infissi delle porte di ingresso e di uscita, all'altezza di 1,5 m dal pavimento. Altri dosimetri vennero applicati agli schermi di vetro piombato al posto di guida del veicolo e sulle pareti esterne. Al fine di evitare errori di valutazione di dose, a causa della forte dipendenza energetica della risposta TL del $\text{CaSO}_4 \cdot \text{Dy}$ alle basse energie, i fosfori vennero calibrati con energie comprese tra i 18 e gli 80 kVp. L'analisi fu fatta su 50 pazienti maschili adulti, sottoposti a radiografie del torace. Nelle seguenti tabelle sono riportati i dati ottenuti in questa serie di osservazioni (Tab. 7 e 8). Questo studio mostra nuovamente come un sistema TLD sia conveniente e sensibile per la determinazione della dose al paziente ed all'operatore.

Tabella 7. - *Esposizioni ottenute su unità radiografiche mobili.*

kVp	mA	Filtrazione totale mm Al	N. totale di casi	Esposizione media in ingresso/mR		Esposizione media in uscita mR
				Sperimentale	Calcolata	
70	20	2,1	20	170 ± 12	178 ± 7	2,5
76	20	2,1	15	231 ± 13	217 ± 7	4,0
80	20	2,1	15	256 ± 29	254 ± 11	5,0

Tabella 8. - *Dosimetria all'interno delle unità radiografiche mobili.*

POSIZIONE TLD	Dose in mR per esposizione
Porta di ingresso	0,40
Porta di uscita	0,70
Vetro di divisione (dalla parte del paziente)	1,4
Vetro di divisione (dalla parte dell'operatore)	Fondo
Sedile	3,3
Altre pareti	Fondo

Negli Stati Uniti, l'esposizione media annuale *pro capite* per indagini cliniche RX è dell'ordine di $142 \cdot 10^{-7} \text{ C kg}^{-1}$ (55 mR). Una frazione significativa di tale quantità sembra doversi assegnare ad indagini diagnostiche e preventive nel settore odontoiatrico. In base a tale ipotesi e per verificarne l'attendibilità, presso il College of Engineering and Applied Sciences dell'Arizona State University, è stato messo a punto uno speciale fantoccio in resina plastica, riproducente la testa umana, con inglobate ossa e denti naturali. La struttura fu quindi ridotta a fette sovrapponibili e perforate in-

ternamente per contenere dosimetri TLD-100 (LiF). L'uso dei TLD-100 è giustificato dal fatto che sono particolarmente adatti a misure nella zona X 25-80 keV, ove risulta una risposta praticamente indipendente dall'energia; inoltre lo $Z(\text{LiF})$ è pari ad 8,1 mentre quello del tessuto ha un valore di 7,4. Anche il fading è trascurabile, aggirandosi sul 5% per anno. I dati riguardanti le misure effettuate sono apparsi su Health Physics [24].

In campo terapeutico, come ben noto, è a volte impossibile determinare teoricamente la dose rilasciata al paziente. Per risolvere tale problema, il gruppo del Service de Carcinologie Radiotherapique dell'Hospital Henri Mondor di Creteil, Toulouse, Francia, ha introdotto l'uso del borato di litio, in discoidi, per il monitoraggio della dose pelle durante trattamento *total-body* [25].

L'uso del borato di litio è motivato nel seguente modo:

- il materiale TL è facile da usare e non richiede annealing tra una misura e l'altra;
- i discoidi sono sufficientemente sottili da permettere misure in quelle regioni ove è importante il gradiente di dose;
- la dipendenza negativa dal borato di litio è molto piccola nelle energie comprese tra 1 e 5 MeV;
- la risposta di questo materiale TL è indipendente dal rateo di dose, almeno sino a 10^3 Gy/pulse (10^6 rad/pulse);
- infine, a parità di condizioni di misura, le caratteristiche del materiale sono in buon accordo con quelle delle emulsioni fotografiche e delle camere a ionizzazione.

La messa a punto del sistema, effettuata tramite un fantoccio antropomorfo Alderson Rando, ha permesso di concludere che la dosimetria a TLD, per la detta applicazione clinica, rappresenta una tecnica altamente affidabile e senz'altro alternativa sia rispetto ad altre tecniche dosimetriche che al calcolo teorico.

Presso il Department of Therapeutic Radiology del Dartmouth Hithcock Medical Center di Hannover, si usa un sistema TLD per il monitoraggio della dose al paziente durante terapia con betatroni da 33 e 45 MeV [26]. Il metodo consiste nell'uso di LiF TLD 700 rods ($1 \times 1 \times 6$ mm), selezionato in modo che lo scarto tra un dosimetro e l'altro non superi il 3%. I rods sono quindi inglobati in capsule di gelatina che, numerate opportunamente, sono poste sulla pelle del paziente. Il lavoro porta quindi a confronto i valori di dose calcolati dalla distribuzione delle isodosi, per il trattamento del carcinoma polmonare, con quelli ottenuti con il sistema TLD. Usando per tale trattamento un fascio X di 33 MeV, con un campo 12×14 cm, con SSD = 110 cm, i dati calcolati e misurati risultano essere in ottimo accordo.

APPLICAZIONI AL TAC.

Fin dalla sua prima apparizione, la tomografia computerizzata del corpo, malgrado i suoi innegabili vantaggi diagnostici, ha suscitato scalpore e critiche per la supposta elevata dose di radiazione erogata al paziente.

Queste critiche sono andate aumentando con l'evolversi delle generazioni di apparecchiature, fino a far affermare a taluni, all'apparizione dei primi scanner di quarta generazione, che il problema della dose erogata rendeva ingiustificato e pericoloso l'impiego clinico di queste macchine.

Negli ultimi anni, su riviste specializzate sono però apparsi articoli dimostranti che, nella media degli scanner, la dose erogata nel corso di una indagine, pur se con differenze talora rilevanti da apparecchio ad apparecchio, non eccedeva i limiti accettabili per un impiego clinico giustificato da un reale vantaggio diagnostico. I sistemi dosimetrici a termoluminescenza si adattano facilmente a tale tipo di osservazioni dosimetriche ed i lavori che qui di seguito si passeranno in rassegna ne evidenziano tutti l'utilizzazione. Un primo lavoro, del 1977, eseguito presso la Division of Radiologic Physics dell'Allegheny General Hospital di Pittsburgh [27], riporta i dati d'esposizione, sia dei pazienti che del personale addetto, per un apparecchio EMI per la TAC del cranio. I TLD usati furono chips TLD-100 e le esposizioni risultarono essere comprese tra $2,58 \cdot 10^{-4}$ e $12,9 \cdot 10^{-4}$ C kg $^{-1}$ (1 e 5 R).

In un altro lavoro del 1978 [28], compiuto presso i Departments of Oncology and Diagnostic Radiology della Mayo Clinic, in collaborazione con il Department of Radiology dell'University of Minnesota Hospital, i valori della dose massima superficiale variano da 20 a 100 mGy (2 a 10 rad), secondo il tipo di esame. Anche in questo caso i rilevamenti dosimetrici sono stati eseguiti con termoluminescenti (TLD-100).

Alcuni ricercatori del Dipartimento di Radiologia della Scuola di Medicina dell'Università di California [29] hanno compiuto un approfondito esame su 7 differenti CT scanner commerciali, usando due fantocci plastici appositamente realizzati per simulare la parte addominale di bambini di 6 mesi e di ragazzi di 10 anni. Le dosi superficiali ed interne furono determinate con dosimetri a termoluminescenza, posizionati sia superficialmente che all'interno dei fantocci. La dose media superficiale, per un esame CT del corpo completo, risultò variare tra 39 e 560 Gy (0,39 e 5,60 rad), in funzione della taglia del paziente e del modello di scanner.

Un altro lavoro, eseguito in collaborazione tra la Health and Safety Research Division dell'Oak Ridge National Laboratory ed il Department of Radiological Sciences dell'Università di California [30], propone un metodo per la determinazione della dose assorbita durante esami CT. Anche in questo caso è stato usato un fantoccio Alderson in abbinamento con rivelatori al LiF in polvere (TLD-100).

La Commissione Nazionale per l'Energia Atomica Argentina, in collaborazione con il Dipartimento CT del Laboratorio Güemes di Buenos Aires, ha presentato al recente Congresso Internazionale di Tolosa sulla termoluminescenza, un lavoro sulla determinazione della dose media assorbita durante esami CT, confrontandone i dati con quelli ottenuti durante esami radiografici classici [31]. Anche in questo caso è stato utilizzato un fantoccio Alderson e dosimetri a termoluminescenza (LiF: TLD-100). I risultati ottenuti hanno dimostrato che con la tecnica CT le dosi assorbite sono più basse di quelle rilevabili con tecniche diagnostiche di tipo classico.

In collaborazione con la II Cattedra di Radiologia del Policlinico Umberto I di Roma, il Servizio di Fisica

Sanitaria - I Cattedra di Fisica Medica dell'Università di Roma, ha compiuto una serie di rilevazioni dosimetriche su differenti CT scanner, comparandone i dati con analoghi esami X diagnostici [32]. Tra le altre, le indagini messe a confronto sono state l'urografia endovenosa e la TC della regione renale. Un dato importante, ricavato da tale confronto, è che la dose superficiale di ingresso in urografia è superiore a quella superficiale massima di tutte le macchine TAC.

APPLICAZIONI IN RADIOBIOLOGIA.

Durante gli ultimi anni le tecniche *partial-body irradiations* sono state ampiamente usate in svariati esperimenti di radiobiologia per studiare, ad esempio, la radiosensibilità di taluni organi e siti tumorali. Tali tecniche di irradiazione implicano l'uso di schermature di piombo di varie forme e spessori, al fine di avvicinarsi il più possibile alla situazione di dose nulla per il tessuto schermato. In ogni caso, comunque, la radiazione scatterata dalle regioni adiacenti non schermate dà luogo a livelli di dose più o meno significativi nelle zone schermate. Al fine di uno studio dettagliato sulla distribuzione della dose durante l'uso delle dette tecniche di irraggiamento, ci si avvale generalmente di fantocci di piccoli animali. Poiché in questo genere di studi è richiesta un'altissima risoluzione spaziale, l'uso dei dosimetri a termoluminescenza risulta essere una necessità.

Passando in rassegna i lavori più interessanti in tale settore, tra i primi risulta essere, in ordine di tempo, quello usato dalla collaborazione tra il Laboratorio di Dosimetria e Biofisica delle Radiazioni del CNEN-CSN Casaccia e l'Istituto di Fisica Medica - Servizio di Fisica Sanitaria dell'Università di Roma [33]. Lo studio dosimetrico compiuto tramite chips di LiF, venne fatto per due casi di irradiazione parziale di un fan-

toccio di topo. Dapprima venne studiata la distribuzione di dose lungo un arto posteriore schermato; in una seconda fase vennero studiate le distribuzioni di dose lungo l'asse longitudinale e quello trasversale del torace del fantoccio, schermandone una metà.

Un più recente lavoro, apparso nel 1980, riguarda i risultati di una intercomparazione tra alcuni Laboratori cooperanti all'interno dell'EULEP [34]. Per tale intercomparazione X-dosimetrica impiegante la tecnica *partial-body irradiations*, è stato realizzato un fantoccio di topo in materiale acrilico ($15 \times 4 \times 4$ cm). Come materiali dosimetrici sono stati usati LiF e $\text{CaF}_2:\text{Mn}$, entrambi in polvere.

Per concludere questa rassegna sull'uso dei dosimetri a termoluminescenza in dosimetria clinica, è bene citare alcune opere più o meno recenti che, pur non essendo specificatamente afferenti alle applicazioni in medicina, sono di grande importanza per una comprensione generale del fenomeno TL, per le caratteristiche dei vari fosfori termoluminescenti, per l'uso che se ne può fare ed infine per le tecniche di misura. Come già citato all'inizio, a partire dal 1965 si sono tenuti periodicamente dei congressi internazionali, i cui proceedings sono di utile consultazione per una indicazione sullo « stato dell'arte » [35-40]. A parte i congressi internazionali, esistono alcuni testi di interesse più generale e tra questi vanno citati il *Solid State Dosimetry* del Becker [41], *Thermoluminescent Dosimetry* di Cameron, Suntharalingam e Kenny [42] ed infine, recentissimo, *Thermoluminescence Dosimetry* di A. McKinlay [43]. L'ultimo libro è la rielaborazione di un Seminario tenuto dallo stesso Autore ai Corsi di Ispra e contiene un ampio settore dedicato alla dosimetria clinica.

Ringraziamenti.

Si ringrazia vivamente la Signora Laura Vecchiarelli per l'aiuto tecnico prestato.

Ricevuto l'11 novembre 1981.

Accettato il 13 febbraio 1982.

BIBLIOGRAFIA

1. MASON, E. W. 1971. Thermoluminescence Response of ^7LiF to U.V. Light. *Phys. Med. Biol.* **16**: 303-310.
2. RANDALL, J. T. & WILKINS, M. H. F. 1945. Phosphorescence and Electron Traps. *Proc. Roy. Soc. A*, **184**: 365-390.
3. GARLICK, G. F. J. & GIBSON, A. F. 1948. The Electron Trap Mechanism of Luminescence in Sulphide and Silicate Phosphors. *Proc. Phys. Soc.* **60**: 574-590.
4. HALPERIN, A. & BRANER, A. A. 1960. Evaluation of Thermal Activation Energies from Glow Curves. *Phys. Rev.* **117**: 408-415.
5. CHEN, R. 1969. On the Calculation of Activation Energies and Frequency Factors from Glow Curves. *J. Appl. Phys.* **40**: 570-585.
6. SUNTHARALINGAM, N. 1980. Current Status of Clinical Applications of TLD in the United States. *Nucl. Instr. Meth.* **175**: 191-192.
7. MANSFIELD, C. M., GALKIN, B. M., SUNTHARALINGAM, N. & CLOW, M. C. 1969. Three-Dimensional Dose Distribution in Cobalt-60 Teletherapy of the Head and Neck. *Radiology*. **93**: 401-404.
8. SUNTHARALINGAM, N. & MANSFIELD, C. M. 1971. LiF Dosimeters in Clinical Radiation Dose Measurements. In: *Proceedings of the Third International Conference on Luminescence Dosimetry*. Ris. 11-14. October 1971: 816-829.
9. MANSFIELD, C. M. & SUNTHARALINGAM, C. 1973. Dose Distribution for Cobalt-60 Tangential Irradiation of the Breast and Chest Wall. *Acta Radiologica*. **2**: 40-46.
10. SUNTHARALINGAM, N. & MANSFIELD, C. M. 1974. The Use of TLD in High Energy Electron and Photon Beam Clinical Dose Measurements. In: *Proceedings of Fourth International Conference on Luminescence Dosimetry*. Krakow-Poland: 27-31 August 1974.
11. RUDEN, B. I. 1975. Evaluation of the Clinical Use of TLD. *Acta Radiologica Therapy Physics Biology*. **15**: 447-464.

12. LANGMEAD, W. A. & WALL, B. F. 1975. A TLD System Based on Lithium Borate for the Measurement of Doses to Patients Undergoing Medical Irradiation. *Phys. Med. Biol.* **21**: 39-51.
13. LANGMEAD, W. A. & WALL, B. F. 1976. An Assessment of Lithium Borate Thermoluminescent Dosimeters for the Measurement of Doses to Patients in Diagnostic Radiology. *Br. J. Radiol.* **49**: 956-862.
14. EACLY, R. A. 1968. Dose and Photon-Energy Measurements for Bone Marrow in a Human Phantom by Thermoluminescence. *Health Phys.* **14**: 557-568.
15. O'CONNOR, M. K., CULLEN, M. J. & MALONE, J. F. 1978. The Influence of Thyroid Geometry on the Response of LiF and CaSO₄ Thermoluminescent Discs to ¹³¹I and ¹²⁵I Irradiation. *Phys. Med. Biol.* **23**: 712-722.
16. KALLINGER, W. & GRANNINGER, W. 1979. The Effect of a High Gamma Dose on a Human Fetus. *Health Phys.* **66**: 1-6.
17. HAMMERSTEIN, G. R., MILLER, D. W., WHITE, D. R., MASTERSON, M. E., WOODARD, H. Q. & LANGHEIN, J. S. 1979. Absorbed Radiation Dose in Mammography. *Radiology*. **130**: 485-491.
18. YULEK, G. & SOYDAN, E. 1979. Determination of Gonadal Dose in Diagnostic Radiology in Turkey. *Health Phys.* **36**: 695-698.
19. BRIERE, J. & PHILIPPON, B. 1979. Absorbed Dose to Ovaries or Uterus during a ¹³¹I-Therapeutic of Cancer or Hyperthyroidism: Comparison between *in vivo* Measurements by TLD and Calculations. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **30**: 643-646.
20. HICKLING, P., LAWRENCE, G. & ROSENBLUM, M. 1979. Total-Body Irradiation in the Preparation of Patients for Bone Marrow Transplantation. In: *XII International Conference on Medical and Biological Engineering - V International Conference on Medical Physics*. Jerusalem, Israel, August 19-24, 1979.
21. GUZZARDI, R., MAY, M. & BUSCOLI, G. 1979. Dosimetric Assessment of the 90° Compton Scattering Tomography (CST) of the Lung. In: *XII International Conference on Medical and Biological Engineering - V International Conference on Medical Physics*. Jerusalem, Israel, August 19-24, 1979.
22. RICHTER, C. W. & ANDERSON, D. N. 1974. *In vivo* Dosimetry of ^{99m}Tc Lung Scanning Agent. *Phys. Med. Biol.* **19**: 73-78.
23. JAIN, M. P., REDDY, A. R., NAGARATHAM, A. & JAIN, P. C. 1979. Use of TLD in Radiation Protection Survey of Mobile Mass-Miniature Radiography Unit. *Br. J. Radiol.* **52**: 499-500.
24. MCKLIEEN, J. W. 1980. X-Ray Exposure to Dental Patients. *Health Phys.* **39**: 211-217.
25. MARINELLO, G., BARRET, C. & BOURGEOIS, J. P. 1980. Lithium Borate Discs for Skin Dose Measurements: Application to Total Body Superficial Electron Beam Therapy. *Nucl. Instr. Meth.* **175**: 198-200.
26. BAGNE, F. 1978. Clinical Use of TLD in Supervoltage X-Ray Therapy. *Radiology*. **119**: 480-482.
27. SHIVARTAVA, P. M., LYM, S. L. & TING, J. Y. 1977. Exposures to Patients and Personnel in Computed Axial Tomography. *Radiology*. **125**: 411-415.
28. MCCULLOUGH, E. C. & PAYNE, J. T. 1978. Patient Dosage in CT. *Radiology*. **129**: 457-463.
29. BRASCH, R. C., BOYD, D. P. & GOODING, C. A. 1978. CT Scanning in Children: Comparison of Radiation Dose and Resolving Power of Commercial CT Scanners. *Am. J. Roentgenol.* **131**: 95-101.
30. YALCINTAS, M. G. & NALCIOGEN, O. 1979. A Method for Dose Determination in Computerized Tomography. *Health Phys.* **37**: 543-548.
31. THOMAS, E., D'ALOTTO, V., NOLLMANN, C. E. & KUNST, J. J. 1980. Determination of Absorbed Doses in a CTS. *Nucl. Instr. Meth.* **175**: 196-197.
32. FURETTA, C. & PASSARIELLO, R. 1980. Studio preliminare della dose ricevuta dal paziente durante esami TAC. *Annali di Radioprotezione*. **2**: 57-67.
33. SCARPA, G., MOSCATI, M. & FURETTA, C. 1979. Use of TLD for Measuring Dose Distribution with High Spatial Resolution in Partial Body Irradiation of Small Animals. *Br. J. Radiol.* **52**: 75-77.
34. PUTTE, K. J., AGRARIAL, M. S., BROERSE, J. J. & TOETCLIEF, J. 1980. Dosimetry Intercomparison for Partial Body X-Irradiation of Rats. *Phys. Med. Biol.* **25**: 13-24.
35. First International Conference on Luminescence Dosimetry. Stanford, June 21-23, 1965. AEC Symposium Series 8. Conf. 650637.
36. Second International Conference on Luminescence Dosimetry. Gatlinburg, Sept. 23-26, 1968. Conf. 680920.
37. Third International Conference on Luminescence Dosimetry. Riso, Oct. 11-14, 1971. Riso Report N. 249.
38. Fourth International Conference on Luminescence Dosimetry. Krakow, Aug. 27-31, 1974. *Inst. Nucl. Physics*, Krakow, 1975.
39. Fifth International Conference on Luminescence Dosimetry. Sao Paulo, Oct. 14-17, 1977. Physikalisches Institut, Giessen.
40. Sixth International Conference on Solid State Dosimetry. Toulouse, France, April 1-4, 1980.
41. BEKER, K. 1973. Solid State Dosimetry. CRC Press.
42. CAMERON, J. R., SUNTHARALINGAM, N. & KENNY, G. N. 1968. *Thermoluminescent Dosimetry*. The University of Wisconsin Press.
43. MCKINLAY, A. F. 1981. *Thermoluminescence Dosimetry*. Adam Hilger Ltd.

Caratterizzazione del metodo per la determinazione del piombo nel sangue in assorbimento atomico col fornello di grafite e la piattaforma di L'vov

GINO MORISI, MARINA PATRIARCA e TEODORA MACCHIA

Laboratorio di Tecnologie Biomediche, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Si descrive un metodo per la determinazione del piombo nel sangue in assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica e con l'uso della piattaforma di L'vov. Vengono riportati i parametri strumentali ottimizzati per due possibili procedimenti analitici. Entrambi sono stati caratterizzati per l'affidabilità mediante il confronto col metodo diretto in assorbimento atomico con fornello di grafite. Si dimostra che l'uso della piattaforma di L'vov permette di eliminare completamente l'effetto matrice e di procedere direttamente al calcolo della concentrazione del piombo del sangue su una curva di taratura allestita con standard acquosi.

Summary (Method for Blood Lead Analysis Using the L'vov Platform with a Graphite Furnace). - A method for blood lead analysis using the L'vov platform with a graphite furnace is described. Optimized instrumental conditions for two analytical procedures are reported. The analytical procedures have been characterized for reliability by comparing them with the most common technique for furnace analysis. The method is free of matrix effect and the values for lead in the blood samples are obtained by direct comparison with linear working curves prepared from aqueous standards.

È noto che l'analisi di elementi in traccia in assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica in fornello di grafite è quasi sempre soggetta ad interferenze della matrice organica del campione. L'vov [1] ed altri AA. [2-5] hanno dimostrato che tali interferenze analitiche possono essere in vario grado attenuate mettendo nel fornello di grafite una sottile piattaforma di grafite sulla cui base viene depositata l'aliquota del campione da esaminare. In questo modo è qualche volta possibile eliminare completamente l'effetto matrice e procedere alla costruzione della retta di taratura per l'analisi usando direttamente semplici standard in soluzione acquosa. Così si elimina il lavoro della preparazione dei campioni per la retta di taratura secondo il metodo dell'aggiunta.

Utilizzando la tecnica della piattaforma di L'vov, sono stati scelti (dopo opportune valutazioni) i parametri di programmazione del sistema di campionamento a fornello di grafite ed i trattamenti del campione e degli standard più idonei ad ottimizzare le

condizioni di incenerimento ed atomizzazione e limitare le interferenze della matrice organica nella determinazione del piombo nel sangue. Sono state così definite due possibili procedure analitiche, entrambe applicate in una serie di prove effettuate al fine della caratterizzazione delle procedure analitiche stesse.

MATERIALI.

Campioni di sangue umano. - 77 campioni di sangue di soggetti adulti appartenenti ad una popolazione insediata in una zona a rischio di contaminazione per la presenza di una fonderia di piombo; 84 campioni di sangue di soggetti adulti rappresentativi di una popolazione di una area urbana non a rischio di contaminazione.

Campioni di sangue per il controllo di qualità. - Preparati dal «Regional Toxicology Laboratory» al Dudley Road Hospital di Birmingham (UK), nell'ambito dell'attuazione della direttiva CEE per la sorveglianza della popolazione contro il rischio di saturnismo [6]. Consistono in una serie di campioni a bassa concentrazione di piombo (8 µg/dl) ed una serie a concentrazione medio-alta (37 µg/dl).

Soluzione madre standard. - Soluzione di nitrato di piombo in acido nitrico 1N al titolo di 1 g/l di piombo (BDH).

Ammonio Fosfato Monobasico RPE (Carlo Erba).

Triton X-100 (Fluka).

APPARECCHIATURA.

Tubi di grafite rivestiti di grafite pirolitica (Perkin-Elmer).

Tubi di grafite (Perkin Elmer) nel cui interno sono state ricavate le guide per l'inserimento della piattaforma di L'vov.

Piattaforme di L'vov (Perkin Elmer).

Spettrofotometro ad assorbimento atomico, dotato di fornello di grafite (Perkin Elmer mod. 5000).

Programmatore per fornello di grafite (Perkin Elmer, mod. HGA 400).

Diluitore automatico, Micromedic System.

METODI

METODO DI DETERMINAZIONE DEL PIOMBO CON FORNETTO DI GRAFITE (metodo di confronto).

Soluzioni standard e curva di taratura. - Si preparano soluzioni standard aggiungendo in 5 contenitori di plastica, contenenti ciascuno 4,5 ml di un pool di sangue umano a bassa concentrazione di piombo, rispettivamente 0,5 ml di soluzione a 0; 100; 200; 400; 600 µg/dl di piombo (preparate dalla soluzione madre). A 100 µl di ciascuna soluzione standard vengono aggiunti 400 µl di una soluzione di triton X-100 allo 0,5% · 10 µl di ciascuna di queste soluzioni vengono depositate sulla parete del tubo di grafite pirolitica, con la micropipetta automatica.

La determinazione del piombo per ogni concentrazione viene effettuata in quadruplicato. Si costruisce la curva di taratura mettendo in ordinata la media dei valori letti per l'assorbanza in corrispondenza di ciascuna concentrazione di piombo, diminuiti del valore letto per la concentrazione 0, ed in ascissa i valori delle concentrazioni del piombo aggiunto.

Trattamento del campione ed analisi. - A 100 µl di campione si aggiungono 400 µl della soluzione di triton X-100 allo 0,5% · 10 µl di campione così trattato vengono introdotti nel fornetto di grafite con la micropipetta automatica. Ogni campione viene analizzato in doppio.

Condizioni spettrofotometriche. - Lunghezza d'onda 283,3 nm; correttore di fondo inserito; espansione di scala x5; lettura dell'altezza di picco.

Programmazione del sistema di campionamento a fornetto di grafite.

STEP	Temp	Ramp time	Hold time	Flusso interno di gas
N.	°C	s	s	ml/min
1.....	80	15	15	300
2.....	120	15	15	300
3.....	500	30	40	20
4.....	2400	0	5	20

METODI DI DETERMINAZIONE DEL PIOMBO NEL SANGUE CON L'USO DELLA PIATTAFORMA DI L'VOV.

Metodo A.

Soluzioni standard e curva di taratura. - Si preparano soluzioni standard di piombo a concentrazioni di 10, 20, 40, 60 µg/dl, in acqua distillata, a partire dalla soluzione madre. A 100 µl di ciascuna delle soluzioni standard vengono aggiunti 400 µl di una soluzione allo 0,5% di triton X-100 · 10 µl di ciascuna di queste soluzioni vengono introdotti sulla piattaforma di L'vov nel fornetto di grafite, con la micropipetta automatica. La determinazione del piombo per ogni concentrazione viene effettuata in quadruplicato. Si costruisce la retta di taratura mettendo in ordinata la media dei valori letti per l'assorbanza in corrispondenza di cia-

scuna concentrazione, ed in ascisse i rispettivi valori delle concentrazioni.

Trattamento del campione ed analisi; condizioni spettrofotometriche e programmazione del sistema di campionamento a fornetto di grafite. - Come descritto precedentemente per il metodo di determinazione del piombo con fornetto di grafite (metodo di confronto).

Metodo B.

Soluzioni standard e curva di taratura. - Si preparano soluzioni standard di piombo a concentrazioni di 10, 20, 40, 60 µg/dl di HNO₃ all'1%.

Col diluitore automatico, a 100 µl di ciascuna delle soluzioni standard vengono aggiunti 750 µl di soluzione all'1% di triton X-100 ed all'1% di NH₄H₂PO₄ · 10 µl di ciascuna di queste soluzioni vengono introdotti sulla piattaforma di L'vov nel fornetto di grafite, con la micropipetta automatica. La determinazione del piombo per ogni concentrazione viene effettuata in quadruplicato. Si costruisce la curva di taratura mettendo in ordinata la media dei valori letti per l'assorbanza in corrispondenza di ciascuna concentrazione ed in ascissa i rispettivi valori delle concentrazioni.

Trattamento del campione ed analisi. - Col diluitore automatico, a 100 µl di campione di sangue si aggiungono 750 µl di soluzione all'1% di triton X-100 ed all'1% di NH₄H₂PO₄ · 10 µl del campione così trattato vengono introdotti sulla piattaforma di L'vov nel fornetto di grafite. Ogni campione viene analizzato in doppio.

Condizioni spettrofotometriche. - Come precedentemente descritto per il metodo di determinazione del piombo con fornetto di grafite (metodo di confronto).

Programmazione del sistema di campionamento a fornetto di grafite.

STEP	Temp	Ramp time	Hold time	Flusso interno di gas
N.	°C	s	s	ml/min
1.....	80	15	15	300
2.....	120	15	15	300
3.....	670	30	20	20
4.....	2100	0	4	20
5.....	2700	0	4	300

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Metodo A.

Per una valutazione complessiva del «metodo A» con l'uso della piattaforma di L'vov, sono state effettuate determinazioni del piombo in 77 campioni di sangue analizzati in doppio sia con questo metodo, sia parallelamente col metodo di confronto. La precisione dei due metodi può essere valutata dalla dispersione dei replicati, utilizzati successivamente nell'analisi della regressione.

La deviazione standard pooled (SD_{pooled}) ottenuta dai 77 duplicati è risultata essere pari a 0,99 µg/dl

con coefficiente di variazione (CV) medio di 2,97 %, per il metodo con la piattaforma di L'vov, e di 1,24 $\mu\text{g/dl}$, con CV medio di 3,69 % per il metodo di confronto.

La differenza di precisione constatata è risultata statisticamente significativa al 5 %. I risultati ottenuti con i due metodi messi a confronto risultano molto ben correlati ($r = 0,992$; $r^2 = 0,985$) e l'andamento osservato nel grafico (Fig. 1) appare spiccatamente lineare.

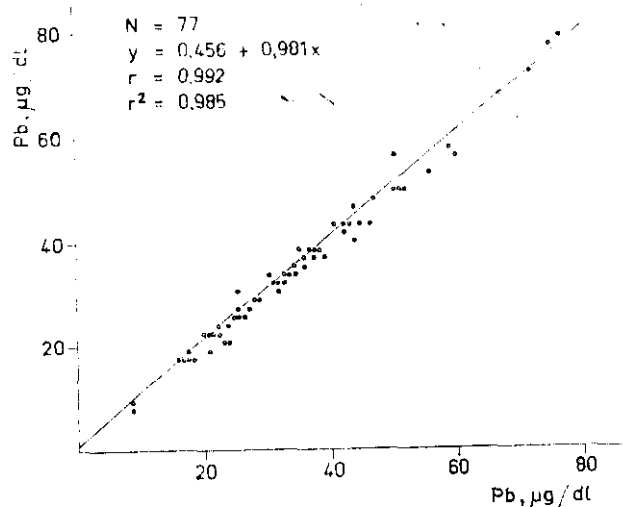


FIG. 1. - Regressione dei valori ottenuti con l'uso della piattaforma di L'vov, Metodo A, (y), verso i valori ottenuti col metodo di confronto (x). Alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli

L'analisi della regressione non mostra evidenza di errori sistematici costanti. L'intercetta stimata è pari a 0,456 $\mu\text{g/dl}$, ma tale valore non è statisticamente diverso da 0 ($p < 0,20$). Gli errori sistematici proporzionali non sembrano avere particolare peso in quanto la pendenza della retta di regressione è molto vicina ad 1 ($b = 0,981$) e peraltro statisticamente indistinguibile da 1 ($t = 1,332$, non significativo). La variabilità attorno alla retta di regressione, misurata come di consueto, dall'errore standard della regressione stimata, è piuttosto contenuto ed è pari a 1,69 $\mu\text{g/dl}$. Inoltre, la precisione e l'accuratezza del metodo con l'uso della piattaforma di L'vov sono state valutate relativamente all'analisi di 3 campioni di sangue per il controllo di qualità. I risultati sono riassunti nello schema seguente:

Valore atteso $\mu\text{g/dl}$	N. replicati	Valore trovato $\mu\text{g/dl}$	CV %
37	17	37,2	2,69
37	17	38,5	2,98
8	10	8,4	3,31

L'accuratezza del metodo con l'uso della piattaforma di L'vov è stata valutata anche mediante prove di recupero effettuate su un campione fresco di sangue (concentrazione = 31,6 $\mu\text{g/dl}$) e due campioni di sangue per il controllo di qualità (concentrazione attesa = 8 $\mu\text{g/dl}$).

I risultati sono riassunti nello schema seguente:

N. DETERMINAZIONI	Pb aggiunto $\mu\text{g/dl}$	Pb trovato $\mu\text{g/dl}$	($\pm$ DS) $\mu\text{g/dl}$
10.....	10	11,0	($\pm$ 0,81)
9.....	20	20,6	($\pm$ 1,04)
9.....	40	39,3	($\pm$ 1,80)
6.....	60	61,3	($\pm$ 1,91)

Metodo B.

Per una valutazione complessiva del «metodo B» con l'uso della piattaforma di L'vov, sono state effettuate determinazioni del piombo in 84 campioni di sangue analizzati in doppio sia con questo metodo, sia, parallelamente, con il metodo di confronto.

La deviazione standard (DS) pooled ottenuta sugli 84 duplicati è risultata essere pari a 0,46 $\mu\text{g/dl}$ con coefficiente di variazione (CV) medio = 2,37 % per il metodo con la piattaforma di L'vov, e 0,59 $\mu\text{g/dl}$ con CV medio = 2,95 % per il metodo di confronto. La differenza di precisione constatata tra i due metodi, per i duplicati effettuati sui campioni esaminati, risulta significativa (al 5 %) anche se questo può essere irrilevante dal punto di vista pratico. I risultati ottenuti con i due metodi messi a confronto risultano molto ben correlati ($r = 0,988$; $r^2 = 0,977$) e l'andamento osservato nel grafico (Fig. 2) appare spiccatamente lineare. La pendenza non risulta statisticamente diversa dall'unità ($b = 1,03$) e pertanto non si ha evidenza di errori proporzionali.

L'analisi della regressione mostra però la presenza di un debole errore costante ($a = -0,99$, $p < 0,05$).

La variabilità attorno alla retta di regressione, misurata dall'errore standard della regressione stimata, è piuttosto contenuto risultando pari a 0,95 $\mu\text{g/dl}$. Al fine di una ulteriore conferma dell'assenza di interferenze analitiche della matrice biologica nel metodo con l'uso della piattaforma di L'vov in esame, sono

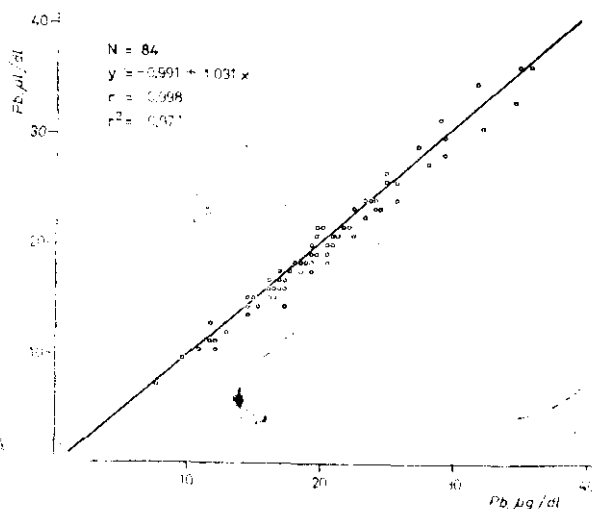


FIG. 2. - Regressione dei valori ottenuti con l'uso della piattaforma di L'vov, Metodo B, (y), verso i valori ottenuti col metodo di confronto (x). Alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli

state statisticamente studiate le due rette di regressione (Fig. 3) costruite coi punti sperimentali ottenuti analizzando, con tale metodo, sia soluzioni acquose che soluzioni preparate da un pool di sangue (come descritto per la preparazione delle soluzioni standard per la curva di taratura del metodo di controllo) a concentrazioni scalari di piombo e, rispettivamente, di piombo aggiunto di 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Le pendenze delle due rette di regressione non sono significativamente diverse tra di loro: il valore del t di Student del confronto delle due pendenze è pari a 1,67, con 35 gradi di libertà, risultato largamente non significativo. Del resto, essendo le pendenze in oggetto pari a 42,91 (soluzioni acquose) e 42,63 (soluzioni in presenza di sangue), a parte ogni considerazione statistica, anche se ci fosse una differenza, questa sarebbe indubbiamente di scarsa rilevanza pratica.

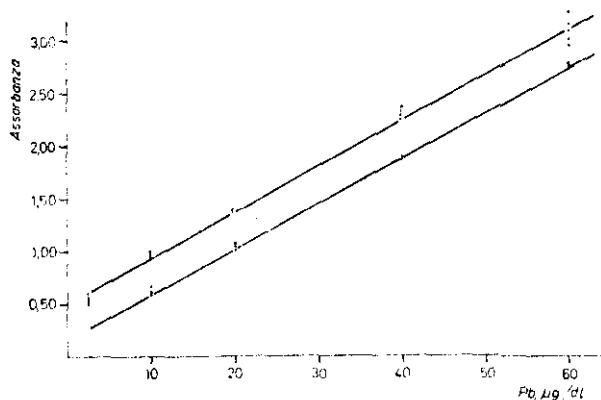


FIG. 3. - Regressione sui valori ottenuti con l'uso della piattaforma di L'vov (Metodo B) su soluzioni acquose (in basso) e soluzioni di un pool di sangue (in alto) a concentrazioni scalari tra 10 e 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ rispettivamente di piombo e di piombo aggiunto

Infine, per valutare l'accuratezza di questo metodo con l'uso della piattaforma di L'vov, sono state effet-

tuate prove di recupero su un campione fresco di sangue a bassa concentrazione di piombo (8,9 $\mu\text{g}/\text{dl}$). I risultati sono riportati nello schema seguente:

N. DETERMINAZIONI	Pb aggiunto $\mu\text{g}/\text{dl}$	Pb trovato $\mu\text{g}/\text{dl}$	($\pm$ DS) $\mu\text{g}/\text{dl}$
9.....	10	10,2	($\pm$ 0,68)
8.....	20	20,4	($\pm$ 0,93)
8.....	40	40,7	($\pm$ 0,46)
8.....	60	59,8	($\pm$ 0,61)

CONCLUSIONI.

L'uso della piattaforma di L'vov per la determinazione del piombo nel sangue, in assorbimento atomico col fornello di grafite, in entrambi i metodi sperimentati si è rivelato capace di eliminare completamente le interferenze analitiche dovute all'effetto della matrice organica complessa del campione. Ciò comporta il notevole vantaggio di eliminare la procedura lunga e spesso difficoltosa (per il non facile reperimento del pool di sangue a bassa concentrazione di piombo) dell'allestimento degli standard per la retta di taratura col metodo dell'aggiunta.

La sensibilità del «Metodo B» (circa 1,7 volte maggiore rispetto al «Metodo A» ed al «Metodo di confronto») permette una diluizione del campione più precisa perché effettuabile con un pipettatore-diluitore automatico (campione/soluzione di Triton in rapporto v/v di 1/7,5). Inoltre, per quanto riguarda la affidabilità, i metodi si sono dimostrati accurati e precisi, di precisione superiore al metodo di confronto che per la sua semplicità e affidabilità è probabilmente il metodo più diffuso nella routine di laboratorio.

Ricevuto il 3 novembre 1981.

Accettato il 5 aprile 1982.

BIBLIOGRAFIA

1. L'VOV, B. V. 1978. Electrothermal atomization—the way toward absolute methods of atomic absorption analysis. *Spectrochim. Acta*. **33 B**: 153.
2. GRÉGOIRE, D. C. & CHAKRABARTI, C. L. 1977. Atomization from a Platform in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.* **49**: 2018.
3. SLAVIN, W. & MANNING, D. C. 1980. The L'vov Platform for furnace atomic absorption analysis. *Spectrochim. Acta*. **35 B**: 701.
4. FERNANDEZ, F. J., BEATY, M. M. & BARNETT, W. B. 1981. Use of the L'vov platform for furnace atomic absorption applications. *Atomic Spectroscopy*. **2**(1): 16-21.
5. HINDERBERGER, E. J., KAISER, M. L. & KOIRTYOHANN, S. R. 1981. Furnace atomic absorption analysis of biological samples using the L'vov platform and matrix modification. *Atomic Spectroscopy*. **2**(1): 1-7.
6. MORISI, G. & COLL. 1980. Programma comunitario sulla sorveglianza biologica della popolazione contro il rischio di saturnismo. *Ann. Ist. Super. Sanità*. **16**(4): 537-644.

Analisi della mortalità e dell'incidenza per melanoma cutaneo in Italia

MARINA MAGGINI, GRAZIA PETRELLI, FLAMINIA PORTOGHESI (a) e CATERINA VOLLONO

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(a) Ospite del Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica nel 1981.

Riassunto. - Il melanoma maligno della pelle, tumore che colpisce prevalentemente la razza caucasica, ha subito negli ultimi anni un rapido incremento in tutto il mondo. Un'analisi dei dati di mortalità, per il periodo 1955-1976, ha permesso di evidenziare un aumento di mortalità in Italia simile a quello che si è verificato in altri paesi europei ed extra-europei. Nel lavoro vengono riportati, inoltre, i risultati, relativi al 1979, di uno studio retrospettivo condotto a Roma per il periodo 1970-1979 che aveva lo scopo di valutare il trend di incidenza del melanoma. Sono stati coinvolti, per la rilevazione dei casi, tutti gli istituti di cura sia pubblici sia privati del comune. L'incidenza stimata è stata, per il 1979, $1,97 \times 100.000$ abitanti.

Summary (Incidence and Mortality of Malignant Melanoma in Italy). - Malignant melanoma of the skin has increased rapidly among white people during the last decades all over the world. Time trend in mortality has been examined in Italy from 1955 to 1976. The incidence of melanoma has been estimated in the population of Rome. All public and private health structures of the city were involved. We considered the first hospitalization of patients with a histological diagnosis of melanoma who were resident in Rome. The data so far available (that for 1979) have shown an incidence of $1.97 \times 100,000$ inhabitants, with small difference between males (1.92) and females (2.02). The most common sites were the trunk (42%) for males and lower limbs (67%) for females.

INTRODUZIONE.

L'incremento dell'incidenza e della mortalità per melanoma ha, negli ultimi anni, suscitato l'interesse di numerosi ricercatori di tutto il mondo; la letteratura su questo argomento è ampia e continua tuttora ad arricchirsi di notevoli contributi.

L'incidenza del melanoma maligno è in rapido aumento nella popolazione bianca (la razza caucasica è la più colpita a livello mondiale) [1-3] ma un certo aumento si registra anche nelle popolazioni negre ed asiatiche [4, 5].

È difficile identificare con certezza il periodo in cui è iniziato tale andamento ascensionale; le prime osservazioni si possono far risalire agli inizi degli anni 1930

e 1940, periodo in cui è iniziata la registrazione della patologia tumorale rispettivamente nel Connecticut e in Danimarca [6].

Molti Autori sostengono che il rapido aumento dell'incidenza del melanoma sia dovuto all'abitudine di esporsi sempre più al sole; attualmente questa ipotesi è in parte contestata e si tende ad attribuire più importanza alle diverse modalità di esposizione. Se il sole ha importanza nel determinismo della malattia, il fattore determinante sarebbe, non tanto la quantità totale di radiazioni ultraviolette, quanto il modo in cui questa radiazione è ricevuta, e di conseguenza il modo in cui viene sollecitato il sistema melanocitario [7, 8]. Altri fattori, naturalmente, intervengono nell'eziologia del melanoma, e si è concordi nel ritenere che le cause che hanno determinato l'incremento dell'incidenza siano strettamente collegate a fattori ambientali [9].

Lo studio di cui riportiamo alcuni risultati è stato programmato per definire, nell'area urbana di Roma, la situazione relativa al melanoma e studiarne l'andamento temporale; lo studio si prefiggeva, inoltre, di analizzare alcuni fattori che si ritengono associati all'eziologia del tumore. La ricerca è stata condotta retrospettivamente per il periodo 1970-1979 per ottenere il trend temporale dell'incidenza.

Nel presente lavoro viene riportata un'analisi della mortalità in Italia per melanoma nel periodo 1955-1976 ed una stima dell'incidenza per l'anno 1979, mentre sono in corso di elaborazione i risultati relativi a tutto il periodo studiato.

DATI E METODI.

I decessi dal 1955 al 1976 per melanoma maligno della pelle (I.C.D. 172) e per tumori maligni in tutte le sedi (I.C.D. 140-290) sono quelli riportati dall'Istituto Centrale di Statistica (ISTAT) basati sulle denunce obbligatorie di morte.

La mortalità è stata calcolata sulla popolazione stimata dall'ISTAT per il periodo in esame; tali stime vengono eseguite in base alla popolazione residente, rilevata dai censimenti decennali, nonché in base alle correnti statistiche anagrafiche, al movimento naturale e migratorio della popolazione.

I dati di popolazione sono disponibili, per il periodo 1955-1971, disaggregati per età, mentre per gli anni 1972-1976 disaggregati sia per età che per sesso.

I tassi di mortalità sono stati calcolati per 100.000 abitanti; i tassi grezzi sono stati corretti per età con standardizzazione diretta utilizzando come popolazione di riferimento quella italiana del 1975.

Lo studio dell'incidenza del melanoma è stato condotto a Roma ed ha coinvolto tutti gli istituti di cura, sia pubblici sia privati del comune, nei quali operasse almeno una delle seguenti branche specialistiche: dermatologia, oncologia, chirurgia generale, chirurgia plastica e radiologia. Gli ospedali identificati sono stati 19 su un totale di 27 e 82 cliniche sulle 131 della città.

Negli ospedali selezionati gli Autori hanno personalmente preso visione dei registri di ammissione e dimissione, dei registri delle analisi istologiche e delle cartelle cliniche. Per la rilevazione dei dati nelle case di cura private si è proceduto ad una indagine epistolare, seguita da una visita personale degli Autori nelle cliniche che avevano segnalato la presenza di casi.

Un caso di melanoma è stato definito come il primo ricovero di un paziente con diagnosi di melanoma della pelle, confermata istologicamente, e con residenza anagrafica nel comune di Roma. Sono stati esclusi i casi di melanoma dell'occhio e delle mucose.

L'incidenza (per 100.000 abitanti) è stata calcolata sulla popolazione residente a Roma nel 1979 (dati forniti dall'Istituto di Demografia dell'Università di Roma); i tassi per sesso sono stati standardizzati per età, con metodo diretto, sulla popolazione totale romana dello stesso anno.

RISULTATI.

Mortalità. - I tassi di mortalità per tumore in tutte le sedi e per melanoma sono riportati nella Tab. 1 insieme ai tassi di mortalità troncata per melanoma, limitata cioè alla classe d'età 30-75 anni. Tale limitazione permette di ottenere un tasso più attendibile perché nelle fasce d'età più giovani (al di sotto dei 30 anni) si ritiene che i tassi siano poco stabili, data la esiguità dei casi di tumore rispetto ad un denominatore molto grande, mentre negli individui molto anziani (più di 75 anni) diminuisce l'affidabilità delle diagnosi di morte [10]. Sia la mortalità per tutte le età sia quella troncata hanno, comunque, un andamento ascensionale del tutto simile, con un aumento percentuale nei 20 anni rispet-

Tabella 1. - *Mortalità per 100.000 abitanti in Italia.*

ANNI	Tumori in tutte le sedi	Melanoma	Melanoma tassi troncati (a)
1955-57.....	161	0,30	0,24
1958-60.....	167	0,38	0,31
1961-63.....	173	0,44	0,35
1964-66.....	182	0,52	0,42
1967-69.....	188	0,67	0,53
1970-72.....	192	0,71	0,57
1973-75.....	192	0,68	0,54

(a) Limitati alla classe d'età 30-75 anni.

tivamente del 127 % e 125 %. Nello stesso periodo la mortalità per tumori in tutte le sedi è aumentata del 19 %. L'incremento di mortalità per melanoma, quindi, si può considerare come un fenomeno particolare con specifiche cause, piuttosto che come riflesso di un generale aumento di mortalità per tutti i tumori.

L'incremento osservato in Italia è in accordo con quanto riportato da altri paesi europei ed extra-europei, e non abbiamo motivi di credere che non sia reale [11-13].

È plausibile pensare che un certo aumento delle certificazioni di melanoma, parallelo ad una diminuzione di quelle per altri tumori della pelle, si sia verificato in seguito alla VI Revisione Internazionale delle Malattie del 1950, che separava il melanoma cutaneo dagli altri tumori della pelle (I.C.D. 173). Noi riteniamo, tuttavia, che un'influenza di questo tipo possa essere stata di qualche rilievo solo nei primi anni dopo l'entrata in vigore della VI Rev. I.C.D., ma che non possa essere responsabile dell'incremento di mortalità per melanoma osservato per i 20 anni.

In Italia, nel periodo considerato, la mortalità per tumori della pelle è effettivamente diminuita dai 786 casi del 1955 (2,27 per 100.000) si è passati ai 444 del 1975 (0,79 per 100.000). Ci sembra ragionevole credere, però, che tale diminuzione sia da attribuire, fondamentalmente, ad un miglioramento dei trattamenti e della diagnosi.

In Fig. 1 è riportata la mortalità per melanoma dal 1972 al 1976 per i due sessi; l'andamento è simile anche se nelle donne i valori si mantengono costantemente più bassi.

La mortalità per melanoma ha subito un notevole incremento in tutte le classi di età (Fig. 2), mantenendo praticamente nel corso degli anni lo stesso andamento caratterizzato da una rapida ascesa nella classe 20-40 anni seguita da un aumento più lento al crescere dell'età. Un modo più complesso ma più esauriente di studiare la mortalità per età è rappresentato dalla analisi per coorti. Questo tipo di analisi permette di separare

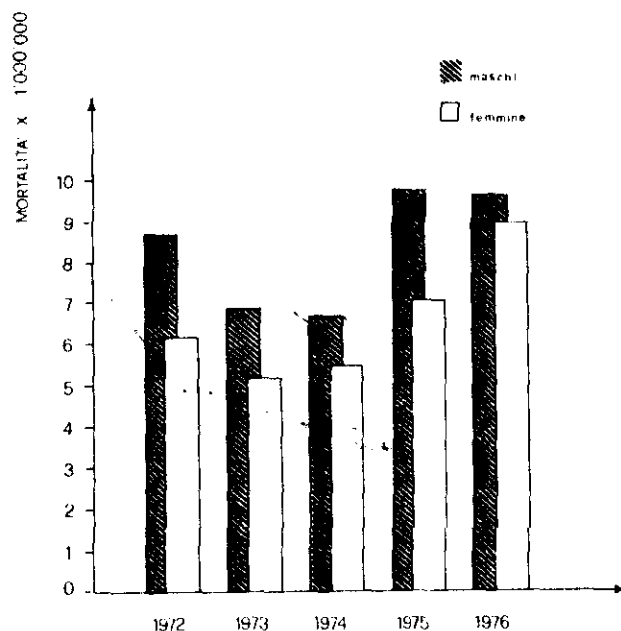


Fig. 1. - *Mortalità per sesso per melanoma maligno della pelle dal 1972 al 1976*

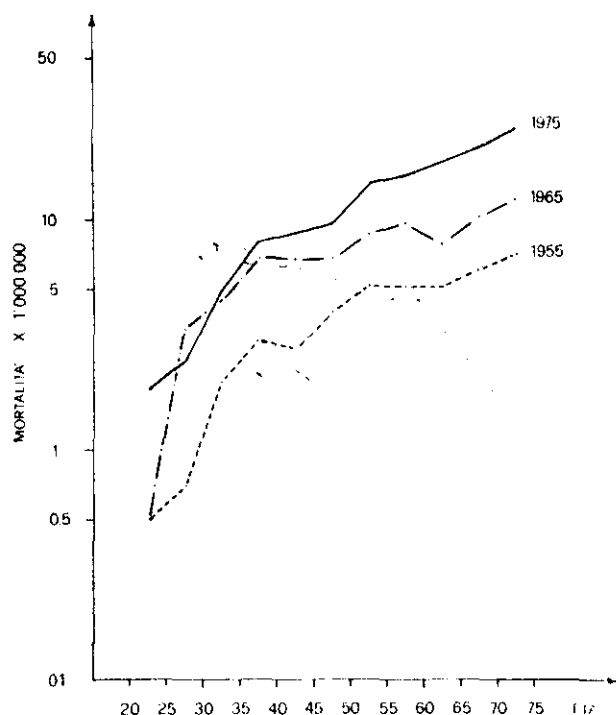


FIG. 2. - Mortalità per età per melanoma maligno della pelle

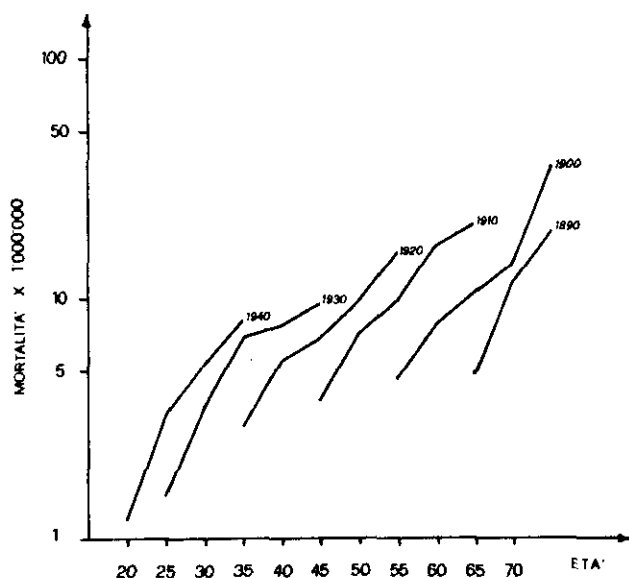


FIG. 3. - Mortalità per melanoma per coorti. Le linee rappresentano la mortalità per età per gruppi nati nello stesso periodo di 5 anni. In figura è indicato l'anno più basso del quinquennio

fra loro le diverse generazioni mostrando, per ognuna di esse, la mortalità sperimentata nel corso degli anni. Nel nostro caso (Fig. 3) sono state considerate 6 coorti seguite per un periodo di 20 anni. Sono evidenti notevoli differenze tra le varie coorti, con una mortalità più elevata per le generazioni più giovani; all'età di 45 anni, ad esempio, i nati nel 1910 hanno una mortalità pari a 3,7 per 100.000 mentre per i nati nel 1920 e nel 1930 il tasso è rispettivamente di 6,9 e 9,6 per 100.000. Analogo andamento è stato riscontrato in altri paesi tra cui Inghilterra, Canada, Finlandia e Norvegia [11, 13-15].

Incidenza. - Dall'indagine svolta nel comune di Roma sono stati rilevati complessivamente, per il 1979, 84 casi di melanoma; di questi 58 sono i pazienti risultati effettivamente residenti a Roma, dopo controllo anagrafico, e 26 quelli che, pur avendo dichiarato (nella cartella clinica) un domicilio nel comune, sono risultati residenti altrove.

L'incidenza è risultata essere 1,97 per 100.000 abitanti, ma questo valore è da considerare leggermente sottostimato dato che la fase operativa dell'indagine (relativamente alle sole case di cura) non è ancora definitivamente conclusa. I dati fino ad ora in nostro possesso ci permettono, tuttavia, di affermare che per questo tipo di patologia l'affluenza alle strutture private è molto limitata e non supera, probabilmente, il 10 % annuo.

I dati, analizzati per sesso e classe di età, sono riportati in Tab. 2. L'incidenza (tassi standardizzati) è pressoché uguale nei due sessi, anche se le donne, analizzando l'andamento per classi di età, risultano colpite in età più giovane rispetto ai maschi.

La distribuzione percentuale dei casi per sito anatomico (Tab. 3) mostra alcune differenze nei due sessi: mentre negli uomini le percentuali più alte si hanno per il tronco e per gli arti inferiori, nelle donne risultano nettamente più colpiti gli arti inferiori rispetto

Tabella 2. - Incidenza per sesso ed età del melanoma nel comune di Roma nel 1979.

CLASSI D'ETÀ	Maschi		Femmine	
	N. casi	Incidenza x 100.000	N. casi	Incidenza x 100.000
15-29.....	3	0,92	5	1,55
30-44.....	4	1,29	11	3,30
45-59.....	10	3,59	11	3,64
60-74.....	6	3,87	6	3,11
75-89.....	1	2,32	1	1,28
Tutte le età	24	$\left\{ \begin{array}{l} 1,69 \\ (a) 1,92 \end{array} \right.$	34	$\left\{ \begin{array}{l} 2,23 \\ (a) 2,02 \end{array} \right.$

(a) Tasso standardizzato.

Tabella 3. - Distribuzione percentuale dei casi per sito anatomico.

SITO	Maschi		Femmine	
	N. casi	%	N. casi	%
Viso-collo	3	12	3	9
Arti sup.	2	8	1	3
Tronco	10	42	5	15
Arti inf.	9	38	23	67
Non specif.	—	—	2	6
Tutti i siti	24	100	34	100

a tutti gli altri siti. I risultati, anche se preliminari, sono in accordo con quanto riportato in letteratura [11, 14, 16].

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

L'andamento della mortalità per melanoma rilevato in Italia è in accordo con quanto osservato in molti altri Paesi, e mette in evidenza l'importanza che tale patologia sta assumendo.

Dall'analisi della mortalità per coorti è risultato evidente che le generazioni più giovani sperimentano una mortalità più elevata che le precedenti; dato che negli ultimi anni si è verificato un miglioramento nella diagnosi e nel trattamento del melanoma, tale andamento si può considerare un riflesso dell'aumento di incidenza. Le generazioni più giovani, quindi, hanno un rischio più elevato di ammalare di melanoma. L'analisi delle cause di questo andamento ha suscitato e suscita tutt'ora un notevole interesse. Particolarmente studiata è la relazione tra fattore etnico-razziale, esposizione al sole ed incidenza. Studi condotti nel Nord America [12, 17], in Norvegia [11], in Finlandia [14] ed in Gran Bretagna [18] hanno dimostrato che l'incidenza e la mortalità per melanoma aumentano al diminuire della latitudine e presumibilmente, quindi, all'aumentare dell'esposizione al sole.

La situazione risulta esattamente inversa qualora venga considerata l'Europa complessivamente, confrontando tra loro le incidenze delle varie nazioni; è risul-

tato, infatti, che l'incidenza diminuisce all'avvicinarsi all'equatore raggiungendo valori minimi nelle nazioni meridionali, Spagna e Malta [17]. I dati di incidenza italiani finora in nostro possesso, sono in accordo con questi risultati.

In conclusione, nell'ambito di una popolazione omogenea sia etnicamente sia per abitudini di vita, l'aumento della esposizione al sole produrrebbe un aumento dell'incidenza del melanoma, mentre in una regione disomogenea come l'Europa, la correlazione sarebbe apparentemente inversa a causa dell'interferenza della componente razziale.

Alcune osservazioni fanno supporre, tuttavia, che la situazione sia ancora più complessa. In Australia e Gran Bretagna, ad esempio, la frequenza del tumore è maggiore fra gli individui che svolgono un lavoro in ufficio che fra gli agricoltori o gli operai, e ciò fa supporre che sia più importante il modo in cui ci si espone al sole, e quindi il tipo di sollecitazioni del sistema melanocitario, piuttosto che la dose totale di radiazioni ricevute [7, 8]. È largamente accertato, comunque, che modificazioni nell'esposizione ai raggi ultravioletti non possono spiegare completamente lo aumento d'incidenza osservato in tutto il mondo e che altri fattori come quelli ormonali, genetici, chimici, debbano avere un ruolo fondamentale nell'eziologia del melanoma [19]. Lo studio da noi condotto in Italia non ci permette finora di entrare nel dibattito sull'eziologia del melanoma ed una discussione più articolata ed approfondita sarà possibile non appena sarà completata l'elaborazione di tutti i dati raccolti.

Ricevuto il 21 dicembre 1981.

Accettato il 5 aprile 1982.

BIBLIOGRAFIA

1. MC GOVERN, V. J. 1977. Epidemiological aspects of melanoma: a review. *Pathology*, **9**: 233-241.
2. JENSEN, O. M. & BOLANDER, A. M. 1980. Trends in malignant melanoma of the skin. *Wld. Hlth. Statistics*, **33**: 2-26.
3. MAGNUS, K. 1977. Incidence of malignant melanoma of the skin in the five nordic countries: significance of solar radiation. *Int. J. Cancer*, **20**: 477-485.
4. CROMBIE, I. K. 1979. Racial differences in melanoma incidence. *Br. J. Cancer*, **40**: 185-193.
5. OHSUMI, T. & SEIJI, M. 1977. Statistical study on malignant melanoma in Japan (1970-1976). *Toboku J. Exp. Med.* **121**: 355-364.
6. HOUGHTON, A., FLANNERY, J. & VIOLA, M. V. 1980. Malignant melanoma in Connecticut and Denmark. *Int. J. Cancer*, **25**: 95-104.
7. HOLMAN, C. D. J., MULRONEY, C. D. & ARMSTRONG, B. K. 1980. Epidemiology of preinvasive and invasive malignant melanoma in Western Australia. *Int. J. Cancer*, **25**: 317-323.
8. LEE, J. A. H. & STRICKLAND, D. 1980. Malignant melanoma: social status and outdoor work. *Br. J. Cancer*, **41**: 757-763.
9. ANONIMO. 1981. The aetiology of melanoma. *Lancet*, **1**: 253-255.
10. WATERHOUSE, J., MUIR, C., CORREA, P., POWELL, J. & DAVIS, W. (Ed.). 1976. *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. III. Lyon. IARC.
11. MAGNUS, K. 1973. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1970. *Cancer*, **32**: 1275-1286.
12. ELWOOD, J. M., LEE, J. A. H., WALTER, S. D., MO, T. & GREEN, A. E. 1974. Relationship of melanoma and other skin cancer mortality to latitude and ultraviolet radiation in the United States and Canada. *Int. J. Epid.* **3**: 325-332.
13. LEE, J. A. H. & CARTER, A. P. 1970. Secular trends in mortality from malignant melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**: 91-97.
14. TEPPA, L., PAKKANEN, M. & HAKULINEN, T. 1978. Sunlight as a risk factor of malignant melanoma of the skin. *Cancer*, **41**: 2018-2027.
15. ELWOOD, J. M. & LEE, J. A. H. 1974. Trends in mortality from primary tumours of skin in Canada. *Can. Med. Assoc. J.* **110**: 913-915.
16. CROMBIE, I. K. 1981. Distribution of malignant melanoma on the body surface. *Br. J. Cancer*, **43**: 842-849.
17. CROMBIE, I. K. 1979. Variation of melanoma incidence with latitude in North-America and Europe. *Br. J. Cancer*, **40**: 774-781.
18. SWERDLOW, A. J. 1979. Incidence of malignant melanoma of the skin in England and Wales and its relationship to sunshine. *Br. Med. J.* **2**: 1324-1327.
19. PETRELLI, G., VOLLONO, C., MAGGINI, M., MORPURGO, G. & PASSI, S. 1982. Alcune ipotesi sull'eziologia del melanoma. *Ig. Sanità Pubblica*, XXXVIII (1-2): 3-10.

Sviluppo e persistenza del supporto umorale nella risposta immunitaria evocata dal vaccino antirabbico (HDGS) in un gruppo di laboratoristi trattato a scopo preventivo

Comunicazione presentata al XXXV Convegno S.I.S. VET
(Gardone-Riviera, 16-19/9/1981).

FRANCO CIUCHINI (a), ANGELO IRSARA (b), SIMONETTA PESTALOZZA (a),
LIVIA DI TRANI (a) e ZEFIRINO ORFELI (a)

(a) Laboratorio di Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova

Riassunto. - Gli AA. valutano l'attività antigenica nell'uomo del nuovo vaccino antirabbico HDGS, coltivato su cellule diploidi umane e inattivato con Beta-propiolattone. Il vaccino è stato somministrato a scopo preventivo ad un gruppo di laboratoristi secondo un calendario che prevedeva tre dosi distanziate di una settimana. Il monitoraggio anticorpale degli emosieri di ogni singolo laboratorista per lo studio dell'attività, è stato effettuato mediante la tecnica di immunofluorescenza su colture cellulari per la determinazione in vitro degli anticorpi neutralizzanti il virus della rabbia. I risultati hanno permesso di elaborare i profili anticorpali individuali che illustrano ed analizzano lo sviluppo e la persistenza della risposta immunitaria di tipo umorale nell'arco di tempo di 779 giorni.

Summary (Development and Persistence of the Immune Response After a Preventive Treatment with HDGS Rabies Vaccine in Laboratory Personell). - The AA. estimate the serological efficacy in man of the new inactivated rabies virus vaccine prepared on a human diploid cell strain. The preventive vaccination trial was performed on a group of laboratory volunteers receiving an immunization schedule of 3 doses at an interval of one week between dose. The antibody response was determined by RFFIT. The single antibody profiles describe the development and the persistence of the humoral response during the study (779 days).

INTRODUZIONE.

La vaccinazione preventiva contro la rabbia per categorie di persone esposte al contagio viene raccomandata come misura di profilassi indiretta soprattutto dopo l'adozione di vaccini prodotti su cellule diploidi umane il cui uso è ormai solitamente privo di effetti collaterali relativamente importanti. Tuttavia l'applica-

zione clinica corrente di questo tipo di vaccino per lo più conosciuto con la sigla HDGS (Human Diploid Cells Strain vaccine) è da considerarsi, in molti Paesi tra cui il nostro, ancora in fase di sorveglianza sperimentale anche se le prime ricerche sull'effettiva capacità immunogena nell'uomo risalgono all'incirca di un decennio.

Dopo diverse esperienze sugli animali, infatti, sono iniziate le più severe valutazioni sull'uomo, dapprima con il vaccino Wyeth, [1] americano, poi con il vaccino Mérieux [2], francese e con il vaccino Behringwerke [3], tedesco, quindi con il vaccino USSR [4], russo: tutti del tipo HDGS [5]. È così che progressivamente le ricerche a riguardo sono andate da più parti intensificandosi: negli Stati Uniti [6-16], in Europa [17-32], in Iran [33], in Thailandia [34], in India [35], per citarne solamente alcune tra le più attente riguardanti appunto l'uso nella profilassi medica di vaccini HDGS il cui successo trova proprio in campo umano continue convalide che ne attestano lo specifico potere antigenico e la notevole tollerabilità clinica. Non mancano tuttavia precise puntualizzazioni a quest'ultimo riguardo [36, 37]. Anche in Italia dopo le prime segnalazioni di rabbia silvestre a partire dal 1977 [38], in alcune regioni del Nord si è sentita la necessità di raccomandare la vaccinazione pre-contagio col vaccino HDGS Mérieux per la prevenzione di categorie di persone (Veterinari, Laboratoristi, Guardiacaccia, ecc. ...) [39] esposte a rischio nei confronti della rabbia. Attualmente, nel nostro Paese, è in corso di registrazione un vaccino coltivato su cellule diploidi umane.

Con questo vaccino parte del personale del Laboratorio di Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità, due anni fa, si è volontariamente sottoposto a vaccinazione preventiva contro la rabbia dovendo sovente esporsi al pericolo di contagio. In questa circostanza si è seguita l'evoluzione della risposta immunitaria di tipo umorale evocata dal Vaccino HDGS, effettuando

un monitoraggio anticorpale sugli emosieri di ogni singolo laboratorista ad intervalli programmati per un periodo di oltre due anni. I livelli degli anticorpi neutralizzanti sono stati determinati con la tecnica d'immunofluorescenza su colture cellulari [40-42], preventivamente standardizzata [43].

Il gruppo di laboratoristi sottoposto a vaccinazione antirabbica era costituito da 13 persone di età compresa tra 35 e 60 anni, di cui 11 di sesso maschile e 2 di sesso femminile. Quattro di loro erano già state trattate con vaccino antirabbico «Fermi», oltre 14 anni prima.

MATERIALI E METODI.

Vaccino. - Il vaccino antirabbico HDCS usato per il trattamento preventivo è stato prodotto dall'Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano «Sclavo» e fornito dalla Direz. Gen. dei Serv. Igiene e Sanità Pubblica del Ministero della Sanità. Tale vaccino è costituito da una sospensione inattivata e liofilizzata di virus rabbico, ceppo Wistar PM/WI 38 1503-RM. Il virus è coltivato in cellule diploidi umane, concentrato e completamente inattivato con Beta-propiolattone, secondo il metodo messo a punto presso i laboratori dell'Institut Mérieux (Francia). Sono stati usati due differenti lotti appartenenti rispettivamente alla serie 19, preparazione n. RO259 e alla serie n. 20, preparazione n. RO376. La vaccinazione è stata condotta nella più scrupolosa osservanza delle norme deontologiche indicate dall'O.M.S. [44].

Schema di vaccinazione e dei prelievi di sangue. - La vaccinazione è stata eseguita presso l'Istituto d'Igiene della Università di Roma secondo un calendario di base che prevedeva 3 dosi da 1 ml di vaccino, inoculate per via sottocutanea profonda nella regione deltoidea a distanza di una settimana l'una dall'altra. Tutti i laboratoristi sono stati sottoposti contemporaneamente ad una stretta sorveglianza siero-immunologica mediante una serie di prelievi di sangue per il dosaggio degli anticorpi; prima dell'inizio del trattamento (tempo 0) e successivamente a 7, 14, 30, 90, 226, 240, 372, 624 e 779 giorni. In due laboratoristi, trattati con solo vaccino HDCS, è stato necessario effettuare in uno un richiamo di sicurezza a 231 giorni dalla vaccinazione di base, nell'altro a 462 giorni. Il primo, avendo avuto un contatto accidentale accertato con virus vaccinale ERA, il secondo presentando invece un tenore anticorpale al limite del valore soglia (0,5 U.I./ml). Al primo dei due soggetti inoltre veniva somministrata, in combinazione con il richiamo, una dose di immunoglobulina umana antirabbica (10 ml = 1500 UI), per via intramuscolare.

Tecnica di determinazione in vitro degli anticorpi. - Il potere antigene del vaccino è stato valutato determinando i livelli di siero-conversione in ogni laboratorista mediante la tecnica rapida d'immunofluorescenza su colture di tessuto. La tecnica adottata viene così schematizzata:

- allestimento di uno stock di virus, ceppo ERA, su cellule BHK-21/C13 (Baby Hamster Kidney) in monostrato e successiva determinazione della TCID₅₀/ml (Tissue Culture Infective Dose 50 %);

- diluizioni a base 2 dei sieri in esame e del siero standard, previa inattivazione a 56 °C per 30 min;

- preparazione delle miscele siero-virus nella porzione di 0,5 ml di siero più 0,5 ml della sospensione di virus contenente 400 TCID₅₀/ml;

- incubazione delle miscele a 35 °C per 90 min;

- trasferimento delle miscele siero-virus in tubi Leighton, contenenti un vetrino di 12 × 32 mm;

- aggiunta di 1 ml di sospensione cellulare, contenente 6×10^5 cellule BHK-21/C13, in ogni tubo Leighton, ed incubazione a 35 °C per 24-48 ore;

- lavaggio dei preparati mediante immersione dei vetrini in tampone salino fosfato 0,01M a pH 7,5, previa rimozione dai tubi Leighton;

- fissazione in acetone raffreddato;

- esposizione dei vetrini ai raggi ultravioletti per 5 min;

- colorazione dei preparati con siero antirabbico coniugato con fluoresceina;

- incubazione in camera umida, in termostato, a 35 °C per 30 min;

- ulteriori lavaggi dei preparati: due in tampone ed uno in acqua bidistillata;

- montaggio dei vetrini con glicerina tamponata su vetrini portaoggetto di 76 × 25 mm;

- osservazione al microscopio per fluorescenza e lettura dei preparati secondo il criterio della conta delle cellule infette fluorescenti rilevabili in un prestabilito numero di campi;

- determinazione del titolo anticorpale col metodo Spearman-Kärber applicato sulla serie delle conte cellulari effettuate per ogni siero;

- trasformazione del titolo anticorpale in Unità Internazionali per millilitro (U.I./ml), di ciascun siero in esame, in rapporto al siero standard contenente 86,6 U.I./ml, e distribuito per conto dell'O.M.S. dall'International Laboratory for Biological Standards, Statens Serum Institut DK-2300 Copenhagen S. Denmark.

La presenza di cellule infette fluorescenti indicano l'assenza di anticorpi virus neutralizzanti nei sieri in esame; mentre monostrati non fluorescenti dimostrano la presenza di anticorpi virus neutralizzanti.

Secondo recenti indicazioni dell'O.M.S., si considerano protettivi i sieri contenenti un titolo anticorpale superiore a 0,5 U.I./ml, a prescindere dalla tecnica usata per la loro determinazione, purché saggiati in rapporto al siero standard.

RISULTATI.

Tollerabilità. - Il vaccino inattivato HDCS è stato ben tollerato da tutti i laboratoristi trattati e non ha dato effetti collaterali di rilievo. Sono state solamente osservate delle reazioni post-vaccinali che normalmente

Tabella 1. - Distribuzione dei titoli anticorpali espressi in unità internazionali per ml.

N. d'ordine	Sesso	Età	Precedenti vaccinazioni antirabbiche (Vac. "Fermi")	Trattamenti vaccinali (HDGS)										Prelievi di sangue					
				1 ^a dose	2 ^a dose	3 ^a dose	4 ^a dose	I t=0	II t=7	III t=14	IV t=30	V t=90	VI t=226	VII t=240	VIII t=372	IX t=624	X t=779		
1	M	56	17 a. fa 14 a. fa	t=0	t=7	t=14	—	0,84	0,61	11,17	16,02	5,40	1,09	n.e.	0,89	1,44	1,59		
2	M	41	14 a. fa	t=0	t=7	t=14	—	0	0,94	19,33	36,48	6,82	3,12	n.e.	5,13	6,54	3,32		
3	F	44	17 a. fa	t=0	t=7	t=14	—	0	0,26	22,92	18,20	10,36	5,05	n.e.	3,24	n.e.	n.e.		
4	M	60	31 a. fa	t=0	t=7	t=14	—	0	1,37	47,89	40,76	8,78	4,58	n.e.	5,50	n.e.	n.e.		
Media geometrica								0,67	22,06	25,65	7,61	2,98			3,01	3,07	2,30		
5	M	60	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	3,29	9,40	2,42	1,04	n.e.	1,46	n.e.	n.e.		
6	M	43	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	5,13	10,36	2,81	2,52	n.e.	4,34	4,62	2,06		
7	M	35	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	5,73	14,46	5,59	3,64	n.e.	1,21	<u>11,60</u>	<u>6,12</u>		
8	M	37	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	3,00	12,92	3,92	1,41	n.e.	3,01	2,64	0,86		
9	M	43	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	3,33	4,68	0,80	0,97	n.e.	1,97	n.e.	n.e.		
10	M	55	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	2,23	12,06	1,52	1,08	n.e.	1,56	n.e.	n.e.		
11	M	49	—	t=0	t=7	t=14	—	0	0	1,44	4,90	2,99	1,44	n.e.	1,78	n.e.	n.e.		
Media geometrica									3,15	9,06	3,41	1,54			1,99	3,49	9,42		
12	M	38	—	t=0	t=7	t=14	t=462	0	0	4,78	14,13	1,52	0,88	n.e.	0,61	↓8,44	8,94		
13	F	38	—	t=0	t=7	t=14	t=2310	0	0	7,24	10,97	1,20	0,85↓	60,63	17,99	20,40	9,42		
Media geometrica									5,88	12,45	1,35	0,86							

Legenda: t = tempo in giorni; a = anni; n.e. = non eseguito; — = valore non computato in media; ↓ = dose richiamo; ° = il soggetto ha ricevuto contemporaneamente 10 ml (1.500 UI) di immunoglobuline umane antirabbiche dell'I.S.V.T. "Sclavo".

si riscontrano nell'uso della maggior parte dei vaccini virali:

- indurimento, arrossamento e dolenzia nel punto di inoculazione per 7 laboratoristi sui 13 trattati, in grado diverso dopo la seconda dose somministrata;

- modesti rialzi febbrili sempre dopo la seconda inoculazione, in 2 soggetti;

- sensazioni più o meno intense di malessere generale non clinicamente accertate ma registrate in base ad asserzioni puramente soggettive, spesso accompagnate da eccessiva emotività.

La somministrazione di immunoglobulina antirabbica omologa ad un unico soggetto, associata ad un richiamo effettuato a 226 giorni di distanza dal trattamento di base, non ha dato luogo ad alcuna manifestazione collaterale, mentre la dose vaccinale di richiamo ha determinato nel punto di inoculazione un intenso arrossamento ed indurimento di grado sensibilmente maggiore alle precedenti dosi somministrate.

Potere antigene. - I risultati della sierconversione dello stimolo antigenico sono stati raccolti nella Tab. 1 e tradotti in grafici (Fig. 1, 2, 3, 4) allo scopo di visualizzare l'andamento della risposta anticorpale neutralizzante il virus della rabbia, e le differenze osservate tra il gruppo di laboratoristi vaccinato solamente con HDCS e il gruppo che oltre l'HDCS aveva ricevuto in passato almeno un ciclo di trattamenti vaccinali con il «Fermi».

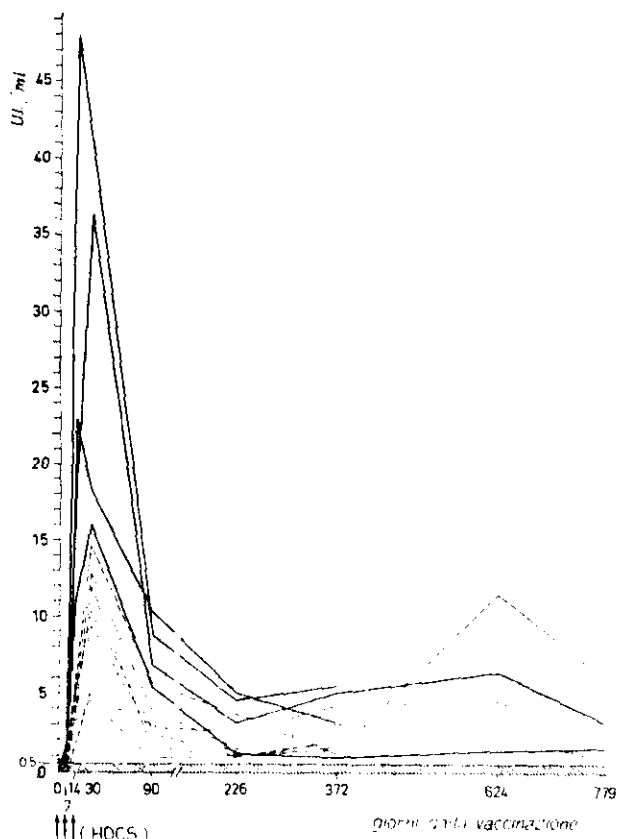


FIG. 1. - Profili anticorpali individuali: (---), laboratoristi vaccinati HDCS; (—), laboratoristi trattati con HDCS, che hanno ricevuto in passato il «Fermi»

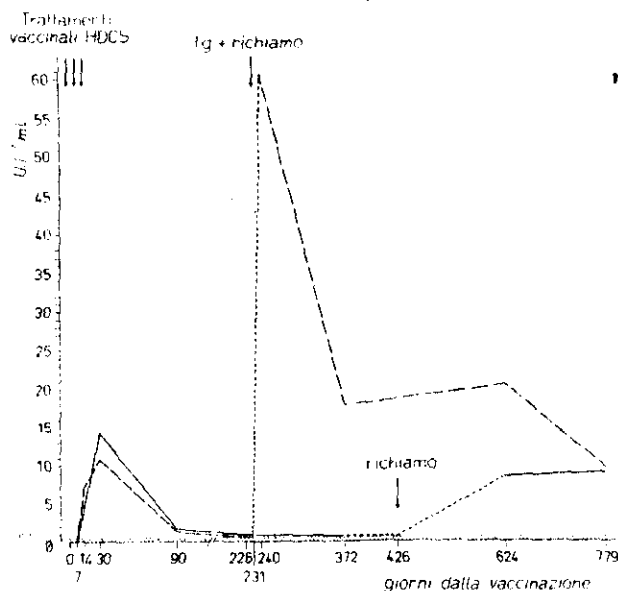


FIG. 2. - Profili anticorpali di due laboratoristi trattati solo con HDCS e che hanno ricevuto vaccinazioni di richiamo

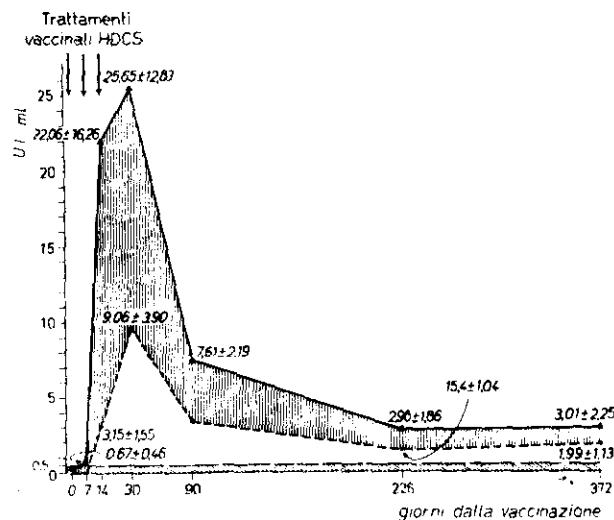


FIG. 3. - Confronto dell'andamento medio degli anticorpi virus-neutralizzanti tra il gruppo che ha ricevuto solo HDCS (---), e quello che oltre l'HDCS ha ricevuto in passato il «Fermi» (—)

Dall'esame dei profili anticorpali dei singoli laboratoristi, si rileva una sierconversione diversa sia per quanto riguarda il tempo inerziale dell'avvio del movimento anticorpale, che il tenore degli anticorpi sierocircolanti raggiunto. In particolare, nei laboratoristi trattati solo con HDCS è possibile osservare a 14 giorni dall'inizio vaccinazione (dopo due somministrazioni HDCS a tempo 0 e a 7 giorni) livelli anticorpali in media tutti al di sopra della soglia protettiva (0,5 U.I./ml) e compresi fra 1,44-7,24 U.I./ml. A 30 giorni si rilevano i livelli anticorpali massimi che vanno da un valore minimo di 4,68 ad un massimo di 14,46 U.I./ml. A 90 giorni si osserva una notevole caduta del tenore anticorpale medio che scende a valori tra 0,80 e 5,59 U.I./ml, dopodiché il fenomeno si attenua e parallelamente diminuisce la dispersione dei valori. Ad un anno di distanza dalla vaccinazione questo gruppo

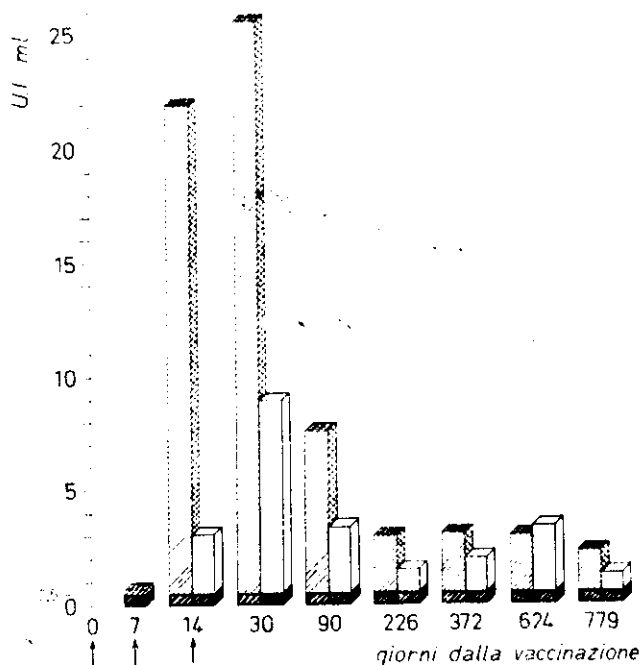


FIG. 4. - Sviluppo e persistenza del tenore anticorpale medio: (non tratteggiato), gruppo HDCS; (tratteggiato), gruppo HDCS con precedenti trattamenti col «Fermi»

di laboratoristi presenta un livello anticorpale medio di 1,99 U.I./ml che si mantiene dopo due anni (a 779 giorni), per i soggetti seguiti, ancora intorno a 1,33 U.I./ml. Il laboratorista contrassegnato, nella tabella, con il n. 7 dimostra invece a 624 e a 779 giorni dalla vaccinazione titoli rispettivamente di 11,60 e 6,12 U.I./ml: livelli che si discostano dalle medie ottenute, determinando un insolito picco nell'andamento del relativo profilo anticorpale. Il soggetto in questione durante l'esperienza si occupava del controllo di laboratorio di vaccini attenuati contro la rabbia per uso veterinario del tipo LEP e ERA, e non ha escluso proprio nello stesso periodo contatti accidentali, mediante siringa, con virus vaccinale. È evidente che incidenti simili potrebbero sortire effetti di richiamo in soggetti preventivamente vaccinati, come in questo caso: in tal senso si potrebbe formulare una spiegazione dell'insolito picco nel corrispettivo profilo anticorpale.

Per il gruppo di laboratoristi che oltre l'HDCS ha ricevuto in passato il vaccino «Fermi», si osserva già a 7 giorni dall'inizio esperienza, cioè dopo una sola dose HDCS somministrata a tempo 0, un consistente movimento anticorpale dell'ordine medio di 0,67 U.I./ml, compreso tra 0,6 e 1,33 U.I./ml: movimento che per il soggetto n. 1 che ha ricevuto in passato ben due stimoli vaccinali completi col «Fermi» (14 e 17 anni prima del trattamento HDCS) preesiste al tempo 0, cioè prima della vaccinazione HDCS di base in un apprezzabilissimo livello di 0,84 U.I./ml. Tutto ciò dimostra una differenza significativa nell'avvio del movimento anticorpale, rilevabile, tra i due gruppi: differenza non solo iniziale ma che si accentua a 14 giorni tanto da raggiungere un fattore 7 tra le medie e mantenersi, in senso quantitativo, di una certa consistenza

per tutto il corso dell'esperienza. È infatti possibile rilevare, per questo gruppo, come la risposta immunitaria raggiunga medie anticorpali di 22,06 U.I./ml a 14 giorni dall'inizio vaccinazione e di 25,65 a 30 giorni, ed ancora di 7,61 dopo 90 giorni fino a restare sempre e decisamente al di sopra della risposta media dell'altro gruppo, nei corrispondenti saggi. Infine è da osservare come per il soggetto n. 4, vaccinato con il «Fermi» ben 31 anni prima, si verifichi la massima sierconversione, raggiungendo dopo 14 giorni dal primo stimolo HDCS livelli di 47,89 U.I./ml, e mantenendosi nel tempo su livelli decisamente alti fino ad essere ad un anno circa di distanza ancora di 5,50 U.I./ml, pur essendo, il soggetto, il più anziano del gruppo.

I laboratoristi contrassegnati con il n. 12 e il n. 13 (Fig. 2) che hanno ricevuto, a differenza degli altri, un richiamo a 462 giorni dalla vaccinazione HDCS di base il primo, e un richiamo a 226 giorni associato a immunoglobulina umana (1500 U.I.) il secondo, dimostrano chiaramente, dopo il trattamento booster, un intenso aumento dei titoli anticorpali specifici con l'evidente instaurarsi di una solida e persistente immunità umorale che raggiunge dopo due settimane, nel soggetto n. 13, un livello di 60,01 U.I./ml e che mantiene dopo un anno dal richiamo ancora a 9,14 U.I./ml.

Dall'esame della Fig. 3, che riporta l'andamento medio e la relativa variabilità dei valori della risposta anticorpale dei due gruppi, si osserva in generale che le risposte umorali sono molto variabili soprattutto per il gruppo che aveva ricevuto anche il «Fermi». Tale variabilità nel tempo va diminuendo e, così, la differenza media tra le due curve che tendono appunto a ravvicinarsi come si può chiaramente vedere nella Fig. 4 in cui è anche evidente che per ambedue i gruppi il tenore anticorpale medio persista al di sopra della soglia protettiva di 0,5 U.I./ml per tutto il corso dell'esperienza di 779 giorni.

CONCLUSIONI.

Merita anzitutto osservare che il vaccino HDCS per la rabbia, somministrato a scopo preventivo ad un gruppo di laboratoristi professionalmente esposti al contagio rabico, non ha dato luogo ad alcuna specifica manifestazione di seria intolleranza. Anche se il numero dei soggetti trattati non è probativo si può comunque affermare che il vaccino presenta un considerevole grado di tolleranza che concorda ampiamente con quanto affermano quasi tutti gli Autori citati in bibliografia a proposito di questo vaccino.

L'attività antigenica del vaccino HDCS si può davvero affermare eccellente: essa ha determinato una consistente sierconversione in tutti i soggetti. La produzione anticorpale si è dimostrata precoce e persistente tanto da essere rilevabile nei soggetti con una precedente storia vaccinale a 7 giorni dalla prima dose somministrata e, nei soggetti dell'altro gruppo, a 14 giorni dall'inizio esperienza, dopo la somministrazione di due dosi di vaccino HDCS (tempo 0 e 7 giorni). Per tutti i soggetti, indistintamente, il movimento anticorpale si manteneva al di sopra della soglia protettiva di 0,5 U.I./ml per tutta l'esperienza. Una risposta immunitaria quindi che nella sua precocità, nella sua solidità e nella sua persistenza conferma di fatto ricerche ana-

loghe riportate nella letteratura scientifica. Un raffronto dettagliato dei dati sperimentali presentati resta assai difficile in quanto gli AA. che ci hanno preceduto adottano schedule vaccinali diverse, tecniche di rilevamento anticorpale differenti in esperienze non sempre strettamente sovrapponibili ma del tutto simili nei loro intenti.

Armengaud e Coll. [45], Aoki e Coll. [46], Cox e Coll. [37] e Plorkin e Coll. [47] adottano calendari di vaccinazione da due a quattro dosi che determinano costantemente una netta sierconversione, come da noi riscontrata, al di sopra di 0,5 U.I./ml al 90° giorno dall'inizio del trattamento, oltre il quale le loro esperienze non si protraggono. Con calendari simili a quelli da noi seguiti, che prevedono tre dosi somministrate a distanza di sette giorni e adottando però la tecnica di sieroneutralizzazione su topo, Kuwert e Coll. [3] e D'Arca e Coll. [48] rilevano, subito dopo il completamento del trattamento vaccinale, titoli anticorpali compresi rispettivamente tra 0,36-71,14 U.I./ml e tra 8,7-69,6 U.I./ml che si mantengono dopo un anno tra 0,36-3,57 U.I./ml e tra 0,61-29,0 U.I./ml: titoli che raffrontati a quelli da noi ottenuti a 30 giorni (tra 4,90-40,76 U.I./ml) e ad un anno (tra 0,61-5,50 U.I./ml) con la tecnica di sieroneutralizzazione su colture cellulari, dimostrano oltre alla validità del calendario anche l'affidabilità della tecnica adottata così come anche Kuwert e Coll. [41] e Grandien [40] dimostrano in specifiche ricerche di comparazione. Nicholson e Coll. [49] adottando sempre un calendario a tre dosi intervallate però di 4 settimane, ottengono in definitiva lo stesso risultato di significativa persistenza del movimento anticorpale che raggiunge al termine di un anno ancora 3,5 U.I./ml contro le nostre 3,49 U.I./ml

mentre inizialmente la nostra schedula vaccinale permette di raggiungere titoli più elevati già al 30° giorno.

Altri risultati, del tutto simili ai nostri nel loro significato protettivo, ma di difficile raffronto, perché magari non espressi direttamente in U.I./ml o non determinati ad intervalli analoghi, sono quelli riportati da Cabasso e Coll. [50], da Costy-Berger [51], da Hafkin [52], da Rosanoff e Tint [53] e da Steck e Coll. [54].

Un'osservazione a parte meritano i risultati relativi ai soggetti con una pregressa vaccinazione antirabbica. In essi la risposta anticorpale raggiunge i titoli più elevati già a 14 gg, dopo la somministrazione di due sole dosi di vaccino. Nel tempo comunque il livello anticorpale medio non si allontana da quello degli altri soggetti così come hanno osservato in esperienze similari anche D'Arca e Coll. [48].

L'intenso movimento anticorpale iniziale, riscontrato in tutti i soggetti vaccinati, potrebbe suggerire un controllo degli anticorpi post-vaccinali più diluito nella prima fase del monitoraggio, condividendo in parte le osservazioni di Ajjan e Coll. [55] che ritengono non necessario un severo monitoraggio anticorpale, appunto, nella fase iniziale di immunizzazione preventiva. L'uso di immunoglobulina omologa, in un unico caso, associata ad un richiamo HDCS, non ha dato origine a fenomeni di interferenza tanto è vero che si è constatato subito un notevole incremento della concentrazione anticorpale che concorda con quanto osservato da Kuwert e Coll. [56].

Per concludere, la tollerabilità ed il potere antigene del vaccino HDCS confermano la validità del calendario di vaccinazione adottato e nello stesso tempo consentono di sostenere l'uso di questo vaccino nella pratica.

Ricevuto il 17 novembre 1981.

Accettato il 19 maggio 1982.

BIBLIOGRAFIA

1. WIKTOR, T. J., PLOTKIN, S. A. & GRELLA, D. W. 1973. Human cell culture rabies vaccine. *JAMA*. **224**: 1170-1171.
2. BAHMANYAR, M. 1974. Results of antibody profiles in man vaccinated with the HDCS vaccine with various schedule. *Symp. Ser. Immunobiol. Standard*. **21**: 231-239.
3. KUWERT, E., MARCUS, I. & HOHER, P. G. 1976. Neutralizing and complement - Fixing antibody responses in pre- and post-exposure vaccines to a rabies vaccine produced in human diploid cells. *J. Biol. Stand.* **4**: 249-262.
4. SINNECKER, H., APITZSCH, L., SINNECKER, R., SELIMOV, M., GIARD, W., GRIMM, J., MUELLER, B., RASCH, G., ZILSKE & COLL. 1978. Serological investigations on rabies tissue culture vaccine (USRR) and development of scort methods in post-exposure treatment. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 155-158.
5. WHO GENEVA. 1975. Report of consultation on rabies vaccine prepared in human diploid cell cultures. *Theran, Iran*, 5-8 May, 1975.
6. ALEXANDER, E. R. 1980. Human diploid cell rabies vaccine: more protection for less risk? *JAMA*. **244**(8): 816.
7. ANDERSON, L. J., WINKLER, W. G., HAFKIN, B., KEENLYSIDE, R. A., D'ANGELO, L. J. & DEITCH, M. W. 1980. Clinical Experience with a human diploid cell rabies vaccine. *JAMA*. **244**(8): 781-784.
8. ANDERSON, L. J., SIKES, R. K., LANGKOP, C. W., MANN, J. M., SMITH, J. S., WINKLER, W. G. & DEITCH, M. W. 1980. Postexposure trial of a human diploid cell strain rabies vaccine. *J. Infect. Dis.* **142**(2): 133-138.
9. ANDERSON, L. J., WINKLER, W. G. & BAER, G. M. 1979. The Center for Disease Control's experience with a human diploid rabies vaccine (abstract No. 475). 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, Mass., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. ANDERSON, L. J., BAER, G. M., SMITH, J. S., WINKLER, W. G. & HOLMAN, R. C. 1981. Rapid antibody response to human diploid rabies vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **113**(3): 270-275.
11. GARNER, W. R., JONES, D. O. & PRATT, E. 1976. Problems associated with rabies preexposure prophylaxis. *J. Am. Med. Assoc.* **235**: 1131-1132.

12. KAPLAN, M. M. 1974. Preliminary results on antibody profiles of human receiving concentrated inactivated vaccine prepared in human diploid cells. *Symp. Ser. Immunobiol. Standard.* **21**: 226-230.
13. KUWERT, E. K., WERNER, J., MARCUS, I. & CABASSO, V. J. 1978. Serovaccination by human immune globulin and HDCS-vaccine against rabies. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 129-136.
14. PLOTKIN, S. A. & WIKTOR, T. J. 1979. Vaccination of children with human cell culture rabies vaccine. *Pediatrics.* **63**: 219-221.
15. PLOTKIN, S. A. 1980. Rabies Vaccine Prepared in Human Cell Cultures: Progress and Perspective. *Rev. Infect. Dis.* **2**(3): 433-438.
16. WINKLER, W. G., ANDERSON, L. J. & HOLMAN, R. 1978. Clinical experience with Wyeth Laboratories HDCS rabies vaccine at the Center for Disease Control. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 167-168.
17. BLANCOU, J., AUBERT, M. F. A. & ANDRAL, L. 1979. Immunité humorale après vaccination contre la rage. Niveaux comparés chez l'homme et l'animal. *Bull. Acad. Vét. de France.* **52**: 491-497.
18. COX, J. H., KLIETMANN, W. & SCHNEIDER, L. G. 1978. Human rabies immunoprophylaxis using HDC (MRC-5) vaccine. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 105-108 (S. Karger, Basel 1978).
19. GERICHTER, C. B., SHTARK, J. & BRAUNSTEIN, I. 1978. Clinical trial with an antirabies human diploid cell vaccine (HDCV). *Dev. Biol. Stand.* **41**: 241-244.
20. HAASE, M. & SCHNEIDER, W. 1978. Die Immunprophylaxe gefährdeter Personen mit Tollwut-HDC-Impfstoff. *Deutsche Med. Wochenschr.* **103**(51): 2033-2036.
21. KUWERT, E., MARCUS, I., WERNER, J., HÖHER, P. G., THRAENHART, O., HIRHOLZER, F., WIKTOR, T. J. & KOPROWSKI, H. 1977. Post-exposure use of human diploid cell culture rabies vaccine. *Dev. Biol. Stand.* **37**: 273-286.
22. KUWERT, E. K., MARCUS, I., HÖHER, P. G., WERNER, J., IWAND, A. & HELM, E. B. 1977. Immunogenicity, efficacy and reactogenicity of a human diploid cell strain (HDCS) rabies vaccine in man; recommendations for pre and post-exposure application (vaccination scheme). *Med. Klin.* **72**(18): 797-805.
23. KUWERT, E. K. 1978. HDCS vaccine: a new highly potent rabies tissue culture vaccine without side-effects and its post-exposure use. *Immun. Infekt.* **6**(2): 193-207.
24. KUWERT, E. K. 1978. Rabies vaccine using the human diploid cell strain (HDCS) vaccine: a major breakthrough in the so-called «rabies protection therapy of man». *D.T.W.* **85**(7): 273-279.
25. KUWERT, E. K., MARCUS, I., WERNER, J., IWAND, A. & THRAENHART, O. 1978. Some experiences with human diploid cell strain - (HDCS) rabies vaccine in pre- and post-exposure vaccinated humans. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 79-88.
26. LEONARDI, G., RUSSO, G. & CASTRO, A. 1980. Nuovi orientamenti in tema di vaccinazione antirabbica. *Ann. Sclavo.* **22**(1): 17-21.
27. MÉAN, F., STECK, F. & TANNER, F. 1978. Humoral immunity conferred by HDCS rabies vaccine Mérieux administered after exposure: 151 cases with and without specific immune globulin of human origin. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 159-161.
28. NICHOLSON, K. G., TURNER, G. S. & AOKI, F. Y. 1978. Immunization with a human diploid-cell strain of rabies virus vaccine: two-year results. *J. Infect. Dis.* **137**(6): 783-788.
29. SELIMOV, M. A., KLYUEVA, E. V., AKSENOVA, T. A., LEBIDEVA, I. R. & GREBENCHIA, L. F. 1978. Treatment of patients bitten by rapid or suspected rabid wolves with inactivated tissue culture rabies vaccine and rabies gammaglobulin. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 141-146.
30. SOULEBOT, J. P. 1974. Résultats sérologique de l'immunisation et de l'hyperimmunisation de l'homme avec un nouveau vaccin antirabique obtenu sur cultures de cellules diploïdes humaines WI-38. La Rage, Colloque, Paris, 1973. Expansion Scientifique Française. J. B. Dureaux (Ed.), pp. 149-155.
31. THRAENHART, O. & KUWERT, E. K. 1979. Rabies specific IgM and IgG antibody response in persons immunized with HDCS vaccine according to the Essen postexposure vaccination schedule. *Zentralbl. Bakteriol.* **245**(4): 429-441.
32. TURNER, G. S., AOKI, F. Y., NICHOLSON, K. G., TYRREL, D. A. & HILL, L. E. 1976. Human diploid cell strain rabies vaccine. Rapid prophylactic immunization of volunteers with small doses. *Lancet*, *i*, pp. 1379-1381.
33. BAHMANYAR, M., FAYAZ, A., NUR-SALEHI, S., MAHAMDEI, M. & KOPROWSKI, H. 1976. Successful protection of human exposed to rabies infection postexposure treatment with the new human diploid cell rabies vaccine and antirabies serum. *JAMA.* **236**: 2751-2754.
34. NELSON, K. E., VITHAVASAI, V., MAKORNKAWKATOON, S., ROSANOFF, E., TINT, H., PLOTKIN, S. A. & WIKTOR, T. J. 1976. Studies of a human diploid cell strain (HDCS) rabies vaccine used with human rabies immune globulin (RIGH). *Proc. A. S. M.* (abstract).
35. SHAH, U., JASWAL, G. S., MANSHARAMANI, H. J., PLOTKIN, S. A. & WIKTOR, T. J. 1976. Trial of human diploid-cell rabies vaccine in human volunteers. *Br. Med. J.* **1**: 997.
36. BOE, E. & NYLAND, H. 1980. Guillain-Barré Syndrome after Vaccination with Human Diploid Cell Rabies Vaccine. *Scand. J. Infect. Dis.* **12**: 231-232.
37. COX, J. H. & SCHNEIDER, L. G. 1976. Prophylactic immunization of human against rabies by intradermal inoculation of human diploid cell culture vaccine. *Clin. Microbiol.* **3**: 96-101.
38. IRSARA, A. 1978. Presenza ed importanza della rabbia in Italia. *Sel. Vet.* **XIX**(3): 78-82.
39. RUATTI, A. 1978. Misure per la lotta contro la rabbia in Italia, con particolare riguardo alla rabbia silvestre in provincia di Bolzano. *Sel. Vet.* **XIX**(3): 143-148.
40. GRANDIEN, M. 1977. Evaluation of tests for rabies antibody and analysis of serum responses after administration of three different types of rabies vaccines. *J. Clin. Microbiol.* **5**(3): 263-267.
41. KUWERT, E. K., THRAENHART, O., MARCUS, I., WERNER, J., ATANASIU, P., BAHMANYAR, M., BOGEL, K., COX, J. H., SCHNEIDER, L. G., TURNER, G. & WIKTOR, T. J. 1978. Comparative study on antibody determination by different methods in sera of persons vaccinated with HDCS rabies vaccine. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 221-229.

42. SMITH, J. S., YAGER, P. A. & BAER, G. N. 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*. **48**: 535-541.
43. IRSARA, A., CIUCHINI, F. & PESTALOZZA, S. 1980. Schema della tecnica di immunofluorescenza su colture di tessuto per la determinazione in vitro degli anticorpi siero-neutralizzanti il virus della rabbia. *Atti SISVET*. **34**: 321.
44. Chronique O.M.S. 1979. Contrôle de la qualité des médicaments. **33**: 311-316.
45. ARMENGAUD, M., AUVERNIAT, J. C., PICOT, N., SAURAT, P. & GANIÈRE, J. P. 1975. Le nouveau vaccin antirabique préparé sur cellules diploïdes humaines. A propos d'une campagne de vaccination préventive auprès du personnel de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. *Rev. Méd. Toulouse*. **11**: 531-535.
46. AOKI, F. Y., TYRREL, D. A. & HILL, L. E. 1975. Immunogenicity and acceptability of a human diploid-cell culture rabies vaccine in volunteers. *Lancet*. **1**: 660-662.
47. PLOTKIN, S. A., WIKTOR, T. J., KOPROWSKI, H., ROSANOFF, E. I. & TINT, H. 1976. Immunization schedules for the new human diploid cell vaccine against rabies. *Am. J. Epidemiol.* **103**: 75-80.
48. D'ARCA, S. U., VESCIA, N., MASTROENI, I. & TARSITANI, G. 1980. Risposta anticorpale al vaccino HDCS nell'uomo: valutazione di una schedula pre-esposizione e influenza di pregressi trattamenti antirabbici. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **31**: 371-381.
49. NICHOLSON, K. G., COLE, P. J., TURNER, G. S. & HARRISON, P. 1979. Immune responses of humans to a human diploid cell strain of rabies virus vaccine: lymphocyte transformation, production of virus-neutralizing antibody, and induction of interferon. *J. Infect. Dis.* **140**: 176-182.
50. CABASSO, V., DOBKIN, M. B., ROBY, R. F. & HAMMAR, A. H. 1974. Antibody response to a human diploid cell rabies vaccine. *Appl. Microbiol.* **27**: 553-561.
51. COSTY-BERGER, F. 1978. Vaccination antirabique préventive par du vaccin préparé sur cellules diploïdes humaines. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 101-104.
52. HAFKIN, B., HATTWICK, M. A. W., SMITH, J. S., ALLS, M. E., YAGER, P. A., COREY, L., HOKE, C. H. & BAER, G. M. 1978. A comparison of a WI-38 vaccine and duck embryo vaccine for pre-exposure rabies prophylaxis. *Am. J. Epidemiol.* **107**: 439-443.
53. ROSANOFF, E. & TINT, H. 1979. Responses to the human diploid cell rabies vaccine: neutralizing antibody responses of vaccines receiving booster doses of human diploid cell rabies vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **110** (3): 322-327.
54. STECK, F., SPENGLER, G. A., HAUSER, R., KELLER, H. & WANDELER, A. I. 1978. IgM and IgG antibody profiles after immunization of man with a HDSC vaccine. *Dev. Biol. Stand.* **40**: 137-139.
55. AJJAN, N., SOULEBOT, J. P., STELLMAN, C., BIRON, B., CHARBONNIER, C., TRIAU, R. & MÈRIEUX, C. 1978. Résultats de la vaccination antirabique préventive par le vaccin inactivé concentré souche rabies PM/WI38 1503-3M cultivées sur cellules diploïdes humaines. *Dev. Biol. Stand.* (S. Karger, Basel, 1978). **40**: 89-100.
56. KUWERT, E. K., WERNER, F., MARCUS, I. & CABASSO, V. J. 1978. Immunization against Rabies Immune Globulin, Human (RIGH) and a human diploid cell strain (HDSC) rabies vaccine. *J. Biol. Stand.* **6**: 211-219.